N° D'ORDRE
59

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jack MASQUELIER

DÉLÉGUÉ DANS LES FONCTIONS DE CHEF DE TRAVAUX
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à PARIS, le 14 Avril 1922

1re Thèse. — RECHERCHES SUR LES PIGMENTS DE LA GRAINE D'ARACHIDE (*Arachis hypogæa* L.).

2e Thèse. — LES MÉTHODES DE DOSAGE DE LA STREPTOMYCINE.

Soutenues le 12 Juillet 1948, devant la Commission d'Examen.

Président ..... M. GENEVOIS, professeur.

Examinateurs... MM. QUÉLET, professeur.
DAVID, professeur.
DEVAUX, professeur honoraire.
TAYEAU, professeur agrégé à la Faculté de Médecine.

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1948

MASQUELIER (Jack)

Recherches sur les pigments de la graine d'Arachide *(Arachis hypogæa* L.). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1948. In-8°, 119 p., fig. pl.

(Thèse Sc. Nat. Bordeaux. 1947-1948. N° 59.)

MASQUELIER (Jack)

Recherches sur les pigments de la graine d'Arachide *(Arachis hypogæa* L.). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1948. In-8°, 119 p., fig. pl.

(Thèse Sc. Nat. Bordeaux. 1947-1948. N° 59.)

MASQUELIER (Jack)

Recherches sur les pigments de la graine d'Arachide *(Arachis hypogæa* L.). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1948. In-8°, 119 p., fig. pl.

(Thèse Sc. Nat. Bordeaux. 1947-1948. N° 59.)

MASQUELIER (Jack)

Recherches sur les pigments de la graine d'Arachide *(Arachis hypogæa* L.). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1948. In-8°, 119 p., fig. pl.

(Thèse Sc. Nat. Bordeaux. 1947-1948. N° 59.)

N° D'ORDRE
59

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jack MASQUELIER

CHEF DE TRAVAUX A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

Né à PARIS, le 14 Avril 1922

1re Thèse. — RECHERCHES SUR LES PIGMENTS DE LA GRAINE D'ARACHIDE (*Arachis hypogæa* L.).

2e Thèse. — LES MÉTHODES DE DOSAGE DE LA STREPTOMYCINE.

Soutenues le 12 Juillet 1948, devant la Commission d'Examen.

Président ..... M. GENEVOIS, professeur.

Examinateurs ... MM. QUÉLET, professeur.
DAVID, professeur.
DEVAUX, professeur honoraire.
TAYEAU, professeur agrégé à la Faculté de Médecine.

BORDEAUX

IMPRIMERIE E. DROUILLARD

3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

—

1948

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

MM.

Doyen ..... BRUS

Doyens honoraires..
- PADÉ ..... Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
- PICART ..... Membre de l'Institut.
- DUPONT ..... Directeur adjoint de l'Ecole Normale supérieure.
- CHAINE
- MERCIER

Professeurs honoraires .....
- PADÉ ..... Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
- BOUNHIOL
- DEVAUX ..... Membre de l'Institut.
- DUPONT ..... Directeur adjoint de l'Ecole Normale supérieure.
- PICART ..... Membre de l'Institut.
- DAURE ..... Recteur de l'Académie de Caen.
- CHAINE
- MERCIER
- KASTLER ..... Professeur à la Sorbonne.

Professeurs .....
- DAGUIN ..... Géologie et Minéralogie.
- MILLOUX ..... Calcul infinitésimal.
- DANGEARD ..... Botanique.
- GENEVOIS ..... Chimie biologique et Physiologie végétale.
- CAU ..... Physique expérimentale.
- BRUS ..... Chimie.
- QUELET ..... Chimie organique.
- AVEL ..... Zoologie et Physiologie animale.
- MONDAIN-MONVAL Chimie minérale et Chimie physique.
- ROUSSET ..... Physique générale.
- ROGER ..... Mécanique rationnelle.
- DUFRESNOY .... Mathématiques générales.
- WEILL ..... Anatomie comparée et Embryogénie.

Professeurs sans chaire.....
- SERVANT ..... Physique.
- BOUNHIOL ..... Zoologie.
- PISOT ..... Calcul des probabilités.
- DAVID ..... Botanique.

Maîtres de conférences honoraires.
- ARRIVAUT
- DE PUYMALY

Maîtres de conférences .....
- GAY ..... Minéralogie.
- ALLARD ..... Chimie.
- SCHŒLLER ..... Géologie.
- MARROT ..... Mathématiques.
- GUIZONNIER .... Physique.

Chargés de suppl^{ce}..
- RIBEREAU-GAYON Chimie biologique et Physiologie végétale.
- MEYNIEUX ..... Mathématiques générales.

Secrétaire ..... ARTIGUELONG

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

AVANT-PROPOS

Dès le début de l'année 1940, le Centre National de la Recherche Scientifique appliquée, prévoyant la possibilité d'une guerre de longue durée, porta toute son attention sur le problème alimentaire et demanda à ses chefs de service d'étudier les aliments de remplacement.

C'est alors que, sous l'impulsion de M. le Professeur MACHEBŒUF, le laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux s'attacha tout particulièrement à l'étude du tourteau d'Arachide.

Ce déchet, habituellement utilisé pour la nourriture des animaux, se montre très riche en protéides dont la valeur alimentaire est loin d'être négligeable. Un certain nombre de travaux, qui à l'époque firent l'objet de rapports au C. N. R. S. A. [115], permirent d'utiliser le tourteau d'Arachide en alimentation humaine et de pallier, en partie tout au moins, la crise alimentaire qu'avait amenée l'occupation de notre pays.

Au cours de ses travaux sur les protéides de la graine d'Arachide, notre Maître, M. le Professeur agrégé TAYEAU, avait eu l'attention attirée par le fait que les solutions extractives de ces protéides présentaient à la longue une légère teinte rose pâle en milieu acide. M. TAYEAU pensa tout de suite que cette coloration devait provenir de la cuticule de la graine. Après avoir constaté que cette substance colorée avait simplement été signalée sans avoir fait l'objet d'étude, il effectua quelques essais préliminaires qui lui permirent de conclure qu'il s'agissait probablement d'une substance apparentée aux anthocyanosides. Ces essais furent simplement mentionnés à l'époque dans la thèse de son élève, M^me^ SARTHOU, puis dans une revue d'ensemble parue par la suite [117, 181].

Lorsque nous sommes venu lui demander un sujet de travail, M. le Professeur agrégé TAYEAU nous proposa d'étudier les

pigments de la cuticule de la graine d'Arachide. Nous avons effectué ces recherches, parfois dans des conditions très pénibles dues aux circonstances, mais toujours dans l'enthousiasme que M. le Professeur agrégé TAYEAU sait communiquer aux travailleurs de son laboratoire. Pendant trois années, nous avons connu, jour après jour, les mille petits ennuis et les mille petites joies qui se montrent inséparables de tout travail de laboratoire. Mais surtout, nous avons acquis, au contact journalier de notre Maître, la formation scientifique et la passion de la recherche, pour lesquelles nous ne saurons jamais lui montrer assez de reconnaissance. Qu'il veuille bien trouver ici une très faible preuve de notre attachement envers lui.

M. le Docteur BLANQUET, Maître de Conférences de Physique, et M. le Professeur agrégé MAYER ont considérablement facilité notre tâche, le premier, pour tout ce qui concerne les mesures spectrographiques, le second, pour la partie histologique et physiologique de notre travail. La grande bienveillance avec laquelle il nous ont accueilli et aidé nous a vivement touché. Nous leur adressons à tous deux l'expression de nos très vifs remerciements.

Que M. le Professeur E. CHAIN, Prix Nobel, Professeur à l'Université d'Oxford, qui, à plusieurs reprises, s'est particulièrement intéressé à notre travail, veuille bien trouver ici, avec notre grande admiration, l'expression de nos respectueux sentiments.

M. le Professeur GENEVOIS nous a accueilli avec la plus grande amabilité. En acceptant de présider notre jury de thèse, il nous a donné une preuve de sa bienveillance. Nous le prions d'accepter l'expression de notre gratitude.

Il nous est particulièrement agréable d'associer encore dans cet hommage reconnaissant ceux, parmi nos Maîtres, qui ont contribué à notre formation.

M. le Professeur CHELLE, qui nous avait jadis accueilli dans son laboratoire, n'a jamais cessé de s'intéresser à nous. Bien souvent, nous avons abusé de son amabilité et bénéficié de son bienveillant appui. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

M. le Professeur SIGALAS a toujours suivi nos travaux de recherches avec le plus grand intérêt. Grâce à sa grande bienveillance, nous avons eu la possibilité de mener à bien, avec la

tranquillité nécessaire, les recherches que nous avions entreprises.

Aujourd'hui encore, il nous propose de nous associer à son enseignement. Nous pesons tout le prix de son amabilité à notre égard. Aussi, sommes-nous particulièrement heureux de lui dédier ce modeste travail, en l'assurant de notre très profonde gratitude.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE CHIMIQUE DES PIGMENTS DE LA GRAINE D'ARACHIDE

CHAPITRE PREMIER

LE TÉGUMENT DE L'ARACHIDE

Le tégument de la graine d'Arachide n'a suscité qu'un nombre très restreint de recherches chimiques. Dans l'industrie, on le considère en général comme un déchet dont on se débarrasse en vue d'obtenir une huile et un tourteau de bonne qualité. Les amandes, qui arrivent le plus souvent aux huileries privées de leurs gousses, sont passées dans des laminoirs successifs, et les fragments de téguments qui s'en détachent sont chassés par ventilation. Après cette opération, connue sous le nom de « dépelliculage », les amandes passent dans les extracteurs, tandis que les fragments de téguments sont recueillis et constituent le son d'Arachide. C'est sous cette forme que les téguments nous ont été fournis par différentes huileries de Bordeaux.

I. — ETUDE BOTANIQUE

Connu sous le nom de pellicule ou de cuticule, le tégument séminal de l'Arachide est sec et friable, papyracé et orné d'un réseau peu apparent de striations irrégulières. Selon Chevalier [35], la coloration du tégument permet de distinguer plusieurs variétés d'Arachides : en général brun rougeâtre, il peut être rouge vif chez certaines sortes, saumon, blanc marbré de vermillon ou uniformément blanc chez d'autres.

Les téguments que nous avons étudiés proviennent d'Arachides récoltées en Afrique Occidentale Française; ils sont colorés en rouge plus ou moins foncé.

Structure histologique

a) *Examen direct.* — L'opacité du tégument rend l'examen microscopique direct assez difficile. Néanmoins, on peut distin-

guer à un faible grossissement les épaississements frangés des cellules épidermiques, reproduits sur la figure 1. En certains endroits de la préparation, particulièrement sur les bords, les tissus sous-jacents ont été arrachés, et l'épiderme paraît constitué d'une seule assise cellulaire. Cette assise est responsable de la coloration rouge, localisée dans de grandes vacuoles occupant presque entièrement l'espace laissé libre entre les épaississements déjà décrits. Parfois, c'est l'épiderme externe qui a été détruit, ce qui met à nu le tissu sous-jacent. Ce dernier présente une coloration jaune et renferme de nombreuses gouttelettes huileuses. On n'y distingue aucune organisation bien définie.

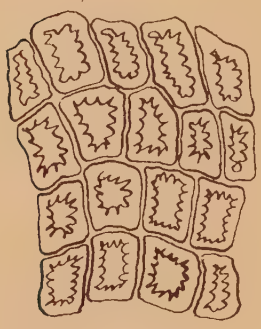


Fig. 1.

b) *Examen après fixation et coloration.* — Des fragments de téguments sont traités selon la méthode classique à l'hypochlorite et colorés au carmino-vert de Mirande. Cette technique, qui éclaircit la préparation en vidant les cellules de leur contenu, ne met en évidence aucun détail nouveau dans la structure de l'épiderme externe et de l'assise médiane. Elle permet de déceler la présence de grandes cellules polygonales bordant la face interne du tégument, représentées sur la figure 2.

c) *Coupe transversale.* — La consistance friable du tégument et sa très faible épaisseur rendent l'exécution des coupes transversales très délicate. Aussi, est-il bon de ramollir les fragments que l'on désire couper au microtome, en les faisant

Fig. 2.

Fig. 3.

séjourner pendant vingt-quatre heures dans un mélange à parties égales d'eau et d'acétone. L'eau, employée seule, n'arrive pas à pénétrer au sein de ce tissu imprégné d'huile. Les minuscules bandelettes découpées au microtome dans l'épaisseur du tégument subissent le traitement à l'hypochlorite et au carmino-vert selon la technique habituelle. La figure 3 montre les différentes assises que l'on peut identifier dans ces préparations.

Le tégument apparaît revêtu d'un épiderme constitué par une seule assise de cellules dont la paroi, fortement cutinisée, présente des épaississements frangés caractéristiques.

Cet épiderme recouvre un parenchyme à faisceaux libéro-ligneux, dans lequel on peut délimiter deux couches distinctes :

1° Une couche externe, faite de grandes cellules polygonales;

2° Une couche interne, constituée par plusieurs assises de cellules aplaties, et terminée par une assise scléreuse.

Au delà, une couche hyaline tient lieu d'épiderme interne; elle est formée d'une seule assise de grandes cellules polygonales n'adhérant que faiblement au parenchyme sous-jacent. Perrot [152] considère cette couche hyaline comme un reste du nucelle.

II. — COMPOSITION CHIMIQUE

Comme toutes les plantes oléagineuses industrielles, l'Arachide a fait l'objet de très nombreux travaux de nature chimique. L'amande constitue le centre attractif de tous ces travaux : sa composition en lipides, glucides et protéides s'avère parfaitement connue; les variations qualitatives et quantitatives de ses constituants ont été étudiées en fonction de facteurs très variés (nature du sol, climat, moment de la récolte, variété botanique, etc.). Parmi les recherches les plus récentes, signalons celles effectuées, à Bordeaux, par Machebœuf et Tayeau [115, 117], puis par Aubertin, Dangoumeau et Castagnou [6] sur le tourteau délipidé, qui sont venues fort à propos mettre en lumière la valeur alimentaire des protéides de l'Arachide. Les gousses elles-mêmes, riches en polyholosides, ont retenu l'attention des chimistes. Seul, le tégument n'a suscité que le faible intérêt accordé en général aux déchets des grandes industries extractives. Il représente le quarantième du poids de l'amande, avec une teneur en huile trois fois plus faible. Après extraction de cette huile, on le

mélange au tourteau, auquel il apporte un supplément de substances azotées. Mais, de l'aveu même des industriels, les tourteaux qui renferment du son d'Arachide sont moins recherchés que les tourteaux purs, leur coloration brunâtre les faisant souvent délaisser par le bétail.

La composition chimique exacte du tégument n'est pas connue; elle ne figure dans aucune des nombreuses monographies de l'Arachide publiées jusqu'à ce jour. Seuls des résultats fragmentaires sont donnés, d'ailleurs assez contradictoires, et d'un intérêt secondaire pour ce qui nous occupe.

Ils concernent la teneur en huile, qui varie de 14 à 19 p. 100, et celle en substances azotées, dont le taux est voisin de 25 p. 100. Le reste, glucides et sels minéraux, n'a fait l'objet d'aucune recherche systématique. Il faut cependant signaler l'intéressant travail de Golse [70] sur l'accumulation du cuivre dans les téguments de certaines graines. Dans le cas de l'Arachide, l'auteur a constaté une accumulation particulièrement intense de ce métal dans le tégument. Voici les résultats des dosages effectués par Golse, exprimés en milligrammes de cuivre par kilogramme de matière sèche et dégraissée :

Gousse	3,9 à 4,6
Amande	14,2 à 21,6
Téguments	90,8 à 141,1

III. — RECHERCHES SUR LES MATIÈRES COLORÉES DU TÉGUMENT

Le premier travail effectué sur les matières colorées du tégument de l'Arachide est celui de Kryz [96], publié en 1922, sous le titre : « Uber farbenreaktion der Samenschalenfarbstoffe der Erdnuss und der Haselnuss (Réaction colorée des matières colorantes des téguments séminaux de l'Arachide et de la Noisette) ». C'est une courte note, où l'auteur se borne à signaler que la matière colorante du tégument de l'Arachide est extractible par l'eau chaude, ce qui permet la recherche des restes de téguments dans les tourteaux, grâce à une série de réactions dont la nature n'est pas indiquée. Vient ensuite une étude un peu plus détaillée du colorant de la Noisette.

Après le travail de Kryz, dix années se sont écoulées et n'ont apporté aucun fait nouveau en ce domaine.

En 1933, au cours d'une série de recherches sur les pigments

anthocyaniques, Lady et Sir Robinson remarquent la présence de leuco-anthocyanes chez de nombreux végétaux, et en particulier dans le tégument de l'Arachide [173]. Les leuco-anthocyanes étant, par définition, des composés incolores, ou très faiblement colorés, leur présence dans le tégument de l'Arachide ne pourrait être décelée qu'après transformation en anthocyanidol, ce qui exigerait un traitement chimique assez énergique. La coloration rouge brunâtre du tégument ne paraît donc pas due à de tels composés. Nous verrons cependant, au cours de ce travail, l'intérêt que l'on peut trouver à leur étude.

Recherches de Tayeau

Tayeau [197] a remarqué l'apparition d'une coloration rouge au cours de l'hydrolyse sulfurique des diverses fractions protéidiques de l'Arachide. Cette coloration rouge vire au vert par alcalinisation du milieu. L'auteur, pensant qu'il s'agissait peut-être d'une impureté entraînée lors de la précipitation des protéides, a répété la même expérience en prenant soin, cette fois, de dialyser préalablement les protéides avant de les soumettre à l'hydrolyse sulfurique. Le même phénomène fut à nouveau observé, ce qui doit faire admettre qu'une matière colorante est intimement unie aux protéides de l'Arachide. Fort peu abondante dans les fractions protéidiques, elle a été retrouvée, par Tayeau, dans la pellicule de la graine. L'auteur a signalé les analogies que présente cette substance avec les pigments anthocyaniques : solubilité dans l'alcool amylique, changements de coloration sous l'influence du *p*H.

CHAPITRE II

A LA RECHERCHE D'UNE MÉTHODE

I. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Lorsque l'on veut extraire une substance organique bien définie d'un tissu végétal, on est généralement guidé, dans le choix du solvant, par la nature chimique de cette susbtance. C'est ainsi que l'on utilise l'éther pour extraire les essences ou les huiles fixes, l'alcool pour les hétérosides, des solutions salines variées pour les protéides. Mais le problème se complique singulièrement lorsqu'il s'agit d'extraire une substance à peu près inconnue. Ce fut le cas pour nos premières recherches sur les substances colorées de la cuticule de l'Arachide : nous n'avions, en effet, aucune idée précise sur leur nature chimique. Nous ne pouvions même pas affirmer qu'il y avait une ou plusieurs substances colorées : la teinte rouge brunâtre de la cuticule pouvait fort bien être due à toute une série de composés plus ou moins différents les uns des autres, mais elle pouvait relever également de la présence d'une seule substance. Le choix du solvant s'avérait donc très délicat; les quelques rares publications que nous avons déjà signalées au début de ce travail ne nous ont apporté qu'un secours très relatif.

Selon Kryz [96], la matière colorante du tégument de la graine d'Arachide est extractible par l'eau chaude. Nous avons vérifié cette assertion : par action de l'eau chaude (on opère au bain-marie à 80° par exemple) on extrait, en effet, une substance colorée donnant une solution brun-rouge. Plusieurs reproches, cependant, peuvent être adressés à cette méthode :

L'emploi de la chaleur doit être évité lorsque l'on désire

conserver dans leur intégrité chimique les molécules organiques souvent très fragiles des colorants végétaux.

L'eau chaude ne peut épuiser totalement les matières colorées du tégument : quel que soit le temps de contact, en effet, la cuticule conserve une teinte rougeâtre en fin d'extraction. Il existe donc au moins une substance insoluble dans l'eau chaude.

Enfin, la solution colorée obtenue par la méthode de KRYZ se trouble par refroidissement : une partie des substances dissoutes se sépare, il se dépose de gros flocons brunâtres très difficiles à redissoudre, même à chaud. On ne peut donc pas affirmer que l'eau chaude soit le solvant idéal des substances colorées que nous voulons étudier.

Les quelques détails que nous ayons pu obtenir sur les travaux de G. W. CARVER [164] ne nous apportent pas de renseignements précis sur les procédés d'extraction. Le livre pourtant si intéressant de RACKHAM HOLT ne donne aucun document d'ordre technique.

Le travail de ROBINSON [173] sur la teneur en leuco-anthocyanes d'un grand nombre de végétaux est, au contraire, remarquablement bien documenté. Pour ROBINSON, le solvant de choix est l'acide chlorhydrique à 1 p. 100. Au moyen de cet acide dilué, l'auteur extrait du tégument de l'Arachide un leuco-anthocyane qu'il transforme facilement en cyanidol. Mais cette substance, incolore par définition, sortait nettement du groupe des matières colorées dont nous avions entrepris l'étude. D'ailleurs, l'acide chlorhydrique à 1 p. 100 se révéla totalement inefficace pour leur extraction.

Les recherches effectuées par TAYEAU [197] devaient retenir plus longuement notre attention. Essayant d'extraire la substance colorée du tégument, TAYEAU utilise comme solvant l'alcool éthylique à 95°, dans lequel il fait passer un courant d'acide chlorhydique gazeux; ce procédé permet d'acidifier l'alcool sans en abaisser le titre. A l'aide de cet alcool acidulé, il est facile d'obtenir, par macération des cuticules, une teinture fortement colorée en rouge sombre. C'est de cette teinture que TAYEAU, après diverses opérations ayant pour but de purifier le produit, réussit à isoler une fraction ayant tous les caractères d'un anthocyanidol, en particulier le virage à la teinte violacée, puis verte, lorsque l'on passe aux *p*H alcalins.

Nous fûmes cependant assez intrigué par la constatation suivante : chacun sait que si l'on triture pendant quelques

instants un pétale rouge de Pélargonium, par exemple, au sein d'une solution alcaline diluée, le pétale change de couleur et devient bleu. Inversement, des pétales de Bluet ou de Violette, exposés aux vapeurs acides, prennent une teinte rouge. Ces faits étaient connus bien avant que la chimie des anthocyanosides ait pris son essor [26, 36]. Or, si l'on tente de reproduire ces expériences sur la cuticule de l'Arachide, on se heurte à un échec : la teinte reste rouge et semble même gagner en intensité lorsque le milieu devient franchement alcalin. Ce fait nous amena bientôt à penser que l'anthocyanidol caractérisé par Tayeau ne devait pas se trouver tel dans la cuticule, ou alors à l'état de traces.

L'hypothèse de la transformation d'un produit inconnu en anthocyanidol au cours de l'extraction effectuée par ce dernier auteur nous parut très vraisemblable lorsque nous avons pris connaissance des travaux de Prillieux [158], de Molisch [126] et de Karzel [88], qui montrent combien cette transformation s'avérait aisée : chez certaines fleurs étudiées par Molisch, la simple exposition aux vapeurs de chloroforme suffit à faire apparaître un pigment rouge vif; Prillieux cite le cas de quelques Orchidées dont les fleurs se colorent en bleu sous l'influence du froid; enfin, Karzel observe que des fleurs non colorées deviennent rouges lorsqu'on les introduit dans un acide étendu.

Il nous parut donc très probable que la méthode d'extraction utilisée par Tayeau transformait en anthocyane un chromogène pré-existant dans la cuticule, l'acidité du solvant étant sans doute responsable de la transformation. Nous ne pouvions dès lors adopter cette méthode, qui ne correspondait pas exactement au but que nous recherchions. En somme, nous n'étions guère beaucoup plus fixé après avoir consulté cette série de travaux : la recherche d'un solvant s'imposait donc de façon toujours aussi impérieuse.

II. — RECHERCHE D'UN SOLVANT POUR L'EXTRACTION

Reprenant le problème à la base, nous avons décidé d'opérer par tâtonnements de la façon suivante : en traitant dans des conditions rigoureusement identiques des poids égaux de cuticules par toute une série de solvants employés en large excès, on obtient, suivant les cas, des solutions plus ou moins chargées de principes dissous, donc plus ou moins colorées. On élimine naturellement les solvants demeurant incolores au contact des cuticules. Afin d'apprécier la quantité de substance dissoute,

on évapore à sec un certain volume de chacune des teintures, et l'on pèse le résidu. D'autre part, on détermine l'intensité de la coloration des solutions par une mesure d'absorption à l'électrophotomètre. En tenant compte de la dilution opérée, nous avons remarqué, dans la plupart des cas, que l'absorption se montrait proportionnelle au poids d'extrait sec : ceci permet de penser que cet extrait est à peu près uniquement constitué par la substance colorée des cuticules. De plus, il s'avérait possible, grâce à cette méthode, de déceler les transformations éventuelles en anthocyanidol signalées plus haut : pour certains solvants, qui favorisent la transformation du chromogène en corps coloré, l'absorption est en effet bien supérieure à celle que le poids d'extrait sec laisse prévoir.

Choix de l'alcool

Nous mettons en contact, dans des vases clos, 10 g. de cuticules en poudre grossière et 100 cm³ de solvant. Après huit jours de macération, au cours desquels de fréquentes agitations sont effectuées, les solvants suivants ne se sont nullement colorés : éther anhydre, éther de pétrole, benzène, toluène, xylène, chloroforme, sulfure de carbone, tétrachlorure de carbone. Au contraire, des solutions colorées sont obtenues avec l'eau distillée, l'alcool méthylique pur, l'alcool méthylique acidifié par l'acide chlorhydrique gazeux, l'alcool éthylique à 95°, l'alcool éthylique à 95° acidifié par l'acide chlorhydrique gazeux, l'alcool isobutylique, l'alcool amylique, le glycol, le glycérol, l'acétone anhydre, l'acide acétique cristallisable, la pyridine.

Ces solutions colorées sont filtrées et amenées à 100 cm³ à l'aide du solvant pur. On en prélève alors 2 cm³ qu'on évapore à sec dans une fiole de Fourneau tarée. On obtient ainsi le poids de l'extrait sec.

Si l'on donne au poids de l'extrait sec obtenu à partir de la solution aqueuse la valeur de l'unité, les autres solvants donnent les taux d'extraction suivants :

Eau distillée	1
Alcool amylique	0,02
Alcool isobutylique	0,03
Acide acétique	0,09
Glycol	0,18
Glycérol	0,26
Acétone	0,54
Alcool méthylique	2,44
Alcool éthylique	4,38

L'alcool éthylique constitue donc le meilleur solvant que nous ayons trouvé au cours de nos essais. Après lui vient l'alcool méthylique qui dissout les substances colorées d'une façon non négligeable. Quant aux autres solvants, ils demeurent bien en deça des deux premiers, aussi les avons nous abandonnés.

Influence du degré de l'alcool sur l'extraction

Lors des essais préliminaires, nous avons utilisé de l'alcool éthylique à 95° et de l'alcool méthylique absolu. Si l'on renouvelle ces essais en faisant varier les titres alcooliques, c'est avec de l'alcool éthylique à 60° que l'on obtient le maximum d'extrait sec, ainsi que le montrent les chiffres réunis dans le tableau I.

TABLEAU I

Degré centésimal.	0	10	20	30	40	50	55	60	70	80	90	100
Extrait sec (en mg. par cm³)	15	25	31,5	36	39,5	42	42,5	42,3	39,5	35	28,5	21

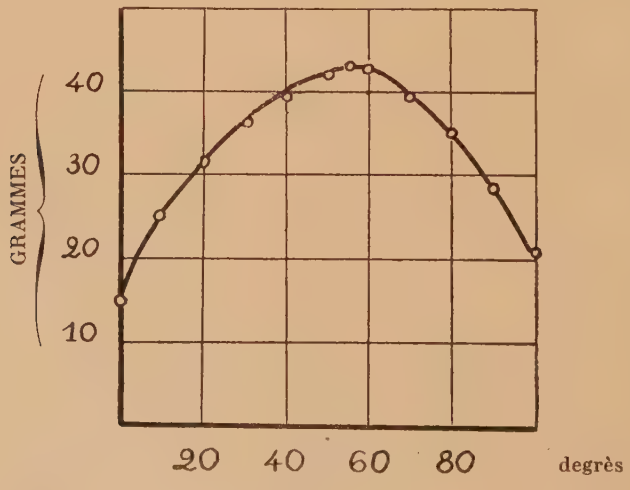


Fig. 4.

Courbe représentative des variations du poids de substances extraites en fonction du degré centésimal de l'alcool employé (cas de l'alcool éthylique).

Si l'on mesure à l'électrophotomètre l'absorption propre à chacune des teintures précédentes, on obtient les chiffres suivants (tableau II) :

TABLEAU II

Degré centésimal ...	0	10	20	30	40	50	55	60	70	80	90	100
Absorption lue à l'électrophotomètre.	12	28	38	48	54	59	60	62	64	63	58	50

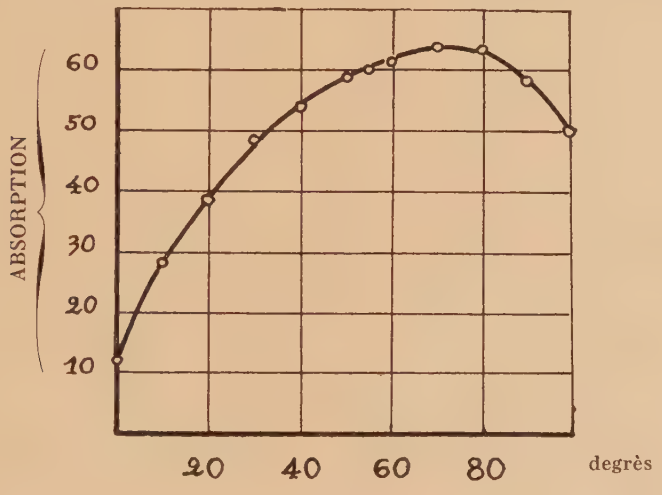


Fig. 5.

Courbe représentative des variations de l'absorption lumineuse des solutions extractives en fonction du degré centésimal de l'alcool utilisé (cas de l'alcool éthylique).

La courbe d'absorption (courbe V) présente pour les alcools dilués la même allure générale que la courbe de solubilité (courbe IV), mais elle ne s'infléchit pas de façon aussi nette dans la zone des alcools forts.

Avec l'alcool méthylique, on obtient des résultats analogues, à cette différence près que la valeur maximum de l'extrait sec et de l'absorption est environ deux fois plus faible que dans le cas précédent.

Les deux courbes montrent d'une façon à peu près certaine

que des alcools de différents titres n'extraient pas des substances identiques. La quantité d'extrait sec n'est pas seule à varier, elle est accompagnée de variations qualitatives. Si les alcools dilués ou forts se chargeaient d'une seule et même substance colorée, les deux courbes présenteraient la même allure. Ceci se produit d'ailleurs pour les alcools de titre inférieur à 60°. Aux plus fortes concentrations, il semble que l'extrait, dont le poids va en diminuant, devient de plus en plus riche en un constituant fortement coloré, absorbant donc fortement la lumière. Nous verrons plus loin se confirmer cette hypothèse. A la suite de ces considérations, il est donc assez délicat de se prononcer dans le choix du titre de l'alcool à utiliser. Des raisons techniques nous ont fait pencher cependant en faveur de l'alcool fort. Elles seront exposées dans les pages qui suivent.

III. — PROCÉDÉ INITIAL D'EXTRACTION

Les essais décrits jusqu'à présent nous ont permis de constater que l'alcool éthylique paraissait le solvant de choix des substances colorées du tégument. Nous avons pu préciser en outre que le degré de l'alcool utilisé devait être assez élevé et que l'extraction devait être conduite en milieu neutre. Le procédé que nous allons décrire à présent tient compte de nos premiers résultats expérimentaux. Il comporte deux opérations distinctes : la préparation d'une teinture alcoolique par macération, et la récupération de l'extrait sec par distillation de l'alcool.

1° Préparation de la teinture alcoolique

On obtient cette teinture par macération. Dans un récipient de 1.500 cm^3, on met en contact 100 g. de téguments et un litre d'alcool à 95°. Tous les jours, on agite énergiquement le flacon. Selon l'état de division des téguments, l'alcool surnage de quelques travers de doigt ou suffit à peine à humecter la masse. En général, les proportions que nous indiquons ne sont pas à modifier. Après une semaine de contact, on filtre la teinture sur papier. Le résidu est exprimé dans un linge, et l'alcool ainsi récupéré est filtré et réuni au premier filtrat. On obtient, de cette façon, 850 à 900 cm^3 d'une teinture fortement colorée en rouge brunâtre, d'odeur aromatique et de saveur très astringente.

2° Distillation

Nous utilisons un appareil en Pyrex à rodages normalisés et joints au mercure. La tenue de vide de cet appareil est remarquable, et permet de faire distiller l'alcool aux alentours de 40°, avec une simple trompe à eau. Le ballon, d'une contenance de deux litres, est chauffé modérément au bain-marie électrique. En moins d'une heure, la distillation est achevée. On prend soin d'ajouter à la teinture alcoolique quelques pincées de carbonate de calcium destinées à maintenir le milieu aussi rigoureusement neutre que possible pendant le chauffage. Quelques billes de verre régularisent l'ébullition.

Résultat et critique de la méthode

Nous avons utilisé l'alcool à 95° d'une façon peut-être un peu arbitraire, mais nous avions l'espoir d'obtenir, avec un alcool fort, un résidu sec en fin de distillation; il n'en fut rien. Quand tout l'alcool est distillé, il reste dans le ballon une masse rougeâtre, à demi-liquide, qui ne change pas d'aspect, même lorsque l'on intensifie le vide et que l'on augmente la température du bain-marie. Après refroidissement, la masse acquiert la consistance d'un extrait mou. Nous avons essayé de triturer une portion de ce résidu en présence d'eau. Nous avons remarqué qu'une substance huileuse surnageait après repos de la phase aqueuse. Une autre portion fut triturée avec de l'éther de pétrole, et ce dernier fut filtré. Par évaporation, le solvant abandonna une huile jaune d'or, se solidifiant après un bref séjour à la glacière, et présentant tous les caractères organoleptiques de l'huile d'Arachide.

C'est donc la présence de lipides, dissous par l'alcool à 95°, qui donne au résidu de distillation la consistance signalée plus haut.

Ce résultat n'est guère satisfaisant, car il est à peu près impossible de recueillir intégralement ce résidu qui adhère fortement aux parois du ballon. Il faut dissoudre ce que l'on ne peut récupérer, au moyen d'alcool à 95°, et conserver cette solution pour l'ajouter à la teinture lors d'une distillation ultérieure. La portion que l'on a réussi à extraire de l'appareil doit être lavée à plusieurs reprises par un solvant approprié, mais seule une extraction au Soxhlet vient à bout des dernières traces de lipides qui l'imprègnent.

IV. — SUR LA NÉCESSITÉ DE DÉLIPIDER LES CUTICULES

Premiers essais

En vue de remédier à l'inconvénient que nous venons de signaler, nous ne pouvions songer à changer de solvant, l'alcool étant de loin le meilleur. Nous avions bien pensé utiliser un alcool de titre plus faible, qui ne se chargerait peut-être pas des lipides, mais il fallait effectuer alors une longue distillation à une température plus élevée risquant d'altérer les principes dissous. Nous avons donc décidé de conserver l'alcool à 95° comme solvant et de délipider les téguments avant de les soumettre à la macération. C'est le procédé utilisé par de nombreux auteurs, et en particulier par Schmidt et Kotter au cours de leurs recherches sur la matière colorante de la fleur de Bouillon blanc [188] : ces auteurs commencent par éliminer les graisses et les cires au moyen d'éther de pétrole, avant de passer à l'extraction du colorant. Nous avons vérifié que l'éther de pétrole ne dissolvait aucune trace des substances colorées des téguments, et nous l'avions tout d'abord adopté, de préférence à l'éther qui, s'il n'est pas anhydre, se colore légèrement en rose. Un premier essai de délipidation fut entrepris à l'aide de l'appareil à extraction continue de Kumagawa et Suto. Après trois heures de contact, les téguments sont récupérés; on chasse le solvant qui les imbibe, par un bref séjour à l'étuve à 37°, puis on les met à macérer dans l'alcool à 95°. La teinture est ensuite distillée comme précédemment. Lorsque tout l'alcool a été chassé, il se forme sur les parois du ballon une sorte de croûte boursouflée qui se détache avec facilité de la surface à laquelle elle adhère. Une baguette de verre légèrement incurvée permet de faire sortir du ballon la totalité du résidu, qui est alors pulvérisé. On obtient finalement une poudre rouge brunâtre, à reflets brillants, beaucoup plus aisée à manipuler que l'extrait mou chargé de lipides.

Délipidation a l'aide de l'appareil de Machebœuf et Fethke

La délipidation préalable des téguments constitue une amélioration très satisfaisante de notre premier procédé d'extraction. Elle présente toutefois un inconvénient d'ordre technique : la capacité des cartouches filtrantes de l'appareil de Kumagawa est assez faible. Dans le plus grand modèle que

nous ayons pu mettre en service, nous ne pouvions introduire que 50 g. environ de téguments. Dans ces conditions, il faut se livrer à de multiples opérations avant de réunir un poids assez considérable de matériel propre à l'extraction des substances colorées. Au cours de ces manœuvres répétées, les pertes de solvant s'accumulent : en particulier, l'éther de pétrole, qui imprègne la cartouche et les téguments, est perdu à chaque extraction. Nous avons pensé qu'il y aurait intérêt à utiliser un appareil nous permettant de traiter, en une seule opération, une plus grande quantité de téguments, et nous avons alors mis en œuvre l'appareil de Machebœuf et Fethke [116], conçu par ces auteurs pour extraire les différents lipides du bacille tuberculeux.

Cet appareil nous a rendu de grands services en nous permettant de traiter en une seule opération environ dix fois plus de pellicules qu'avec l'extracteur de Kumagawa et Suto. Un autre avantage réside dans le fait que le solvant se refroidit énergiquement avant d'arriver au contact des téguments; dans ces conditions, il dissout parfaitement les lipides, mais n'entraîne pas l'un des pigments étudiés au cours de ce travail, ce qui en facilite l'extraction ultérieure.

Emploi de l'éther anhydre

Pour alimenter l'extracteur, nous avons substitué à l'éther de pétrole actuellement fort rare, l'éther ordinaire, que nous rendons parfaitement anhydre par passage sur chlorure de calcium et distillation sur sodium. Cette opération n'est pas inutile, car l'éther du commerce est toujours chargé d'eau, ce qui modifie souvent de façon considérable ses propriétés solvantes. En outre, l'éther ainsi traité est privé de peroxydes.

Bilan de la délipidation

1° *Au point de vue qualitatif.* — Telles que les huileries nous les fournissent, les pellicules sont souillées par de nombreux corps étrangers, en particulier par de la terre, et surtout par de minuscules fragments d'amande réduits à l'état de farine lors du dépelliculage. Ces substances adhèrent fortement aux pellicules grâce à l'huile qui les imprègne et passent de ce fait inaperçues. Après délipidation et évaporation des dernières traces d'éther, tout ce qui souille les téguments se résoud en une fine poussière blanche et les pellicules semblent avoir perdu

leur coloration primitive. Il n'en est rien, car la teinte rouge caractéristique réapparaît lorsque cette poussière a été éliminée au tamis. Le tamisage est effectué au moyen d'un agitateur mécanique, et nous ne livrons ainsi à l'extraction que des téguments privés de toute matière étrangère. La perte de poids consécutive à cette opération oscille autour de 5 p. 100 du poids de matière délipidée.

2° *Au point de vue quantitatif.* — Lorsque l'on introduit dans la cartouche filtrante de l'extracteur un poids connu de produit brut et bien sec, il est facile de connaître le poids des lipides extraits, soit en pesant à nouveau le produit en fin d'extraction, soit en chassant l'éther qui s'est chargé de l'huile. Ce dernier procédé est plus exact que le premier, car il est à l'abri de toute perte de substance.

Dans ce but, on fait fonctionner l'extracteur après avoir ôté la cartouche. Il ne reste bientôt plus que l'huile dans le ballon. Si l'on a pris soin de faire la tare du récipient, une simple pesée donne le taux des lipides. Au cours d'un grand nombre d'extractions faites sur des pellicules d'origines diverses, nous avons obtenu des taux allant de 15 à 20 p. 100 du poids de matière brute.

V. — INFLUENCE JOUÉE PAR L'ACIDITÉ DU SOLVANT MISE EN ÉVIDENCE D'UN CHROMOGÈNE

Nous n'avons pas voulu clore cette série d'essais préliminaires sans préciser d'une façon plus nette l'influence jouée par l'acidité du solvant sur la nature et la quantité des substances extraites. Pour cela, nous avons fait macérer les cuticules délipidées dans de l'alcool à 95° préalablement acidifié par de l'acide chlorhydrique gazeux sec (titre : 1 p. 100). Après huit jours de contact, nous avons filtré et obtenu une teinture rouge sombre analogue à celle que permet d'obtenir l'alcool neutre. Nous pensions que le seul fait d'avoir acidifié le solvant allait nous permettre de reproduire les expériences de Tayeau déjà citées [197]. Nous nous attendions en particulier à voir cette teinture passer du rouge au violet puis au bleu-verdâtre par alcalinisation progressive. Il n'en fut rien : de la potasse alcoolique à 5 p. 100, ajoutée goutte à goutte, ne modifie pas la coloration du milieu. Lorsque l'acidité est neutralisée, un floculat apparaît et, si l'on poursuit l'addition d'alcali, des grumeaux rouges se forment au sein d'un liquide conservant sa coloration initiale.

Nous avons alors pensé qu'il était nécessaire de faire intervenir la chaleur, en milieu acide, pour voir apparaître le composé chimique de nature anthocyanique décrit par TAYEAU.

Nous avons donc laissé pendant une heure, au bain-marie à 80°, un certain volume de la teinture acide. Pour éviter l'évaporation de l'alcool, nous prolongeons le col du récipient d'un long tube de verre qui fonctionne comme réfrigérant à air. Mais même après ce chauffage, les colorations décrites par TAYEAU n'ont pu être reproduites. Quelle différence existait-il donc entre notre expérience et celle réalisée jadis par TAYEAU ?

En étudiant attentivement le mode opératoire préconisé par ce dernier auteur pour l'extraction des substances colorées de la cuticule, nous avons remarqué que TAYEAU faisait évaporer dans le vide la teinture alcoolique acide pour en récupérer l'extrait sec sous forme d'un résidu rouge foncé. Que se passe-t-il au cours de cette distillation ? A mesure que l'alcool distille, l'acidité du résidu s'accroît, et il arrive un moment où les conditions sont telles que l'auteur reproduit d'une façon presque identique le procédé imaginé par ROBINSON [173] pour transformer les leuco-anthocyanes en anthocyanidols : la méthode de ROBINSON consiste, en effet, à extraire les leuco-anthocyanes par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 p. 100, puis à traiter la liqueur obtenue par la chaleur, après avoir amené à 15 p. 100 sa teneur en acide. On voit donc que le premier temps de cette extraction se passe en milieu acide faible, tout comme dans le procédé que décrit TAYEAU. Ensuite, la transformation s'opère à chaud, en milieu acide plus concentré; cette phase est réalisée par TAYEAU lorsqu'il chasse l'alcool par distillation et accroît, par là même, l'acidité du résidu.

Nos vues ont été entièrement confirmées par l'expérience : nous avons évaporé à sec, sous vide, un certain volume de la teinture acide, puis nous avons repris le résidu par quelques cm^3 d'alcool. Lorsque l'on traite cette solution par la potasse alcoolique, elle vire effectivement du rouge vif au gris verdâtre. Le chromogène a bien été transformé en une substance de nature anthocyanique.

On peut même suivre aisément l'apparition de cette substance en procédant de la façon suivante : on détermine tout d'abord le poids d'extrait sec fourni par 1 cm^3 de la teinture acide; on amène ensuite le taux d'extrait sec à une valeur

déterminée en diluant au moyen d'alcool à 95° et une première mesure est faite à l'électrophotomètre.

Dans une seconde expérience, on évapore à sec, sous vide, un volume déterminé de teinture titrée. L'extrait sec est redissous dans le volume initial d'alcool à 95°. Une seconde mesure d'absorption est faite. Voici les résultats de deux séries d'expériences (tableau III) :

TABLEAU III

Extrait sec par cm^3 de teinture (mg.)	Absorption a l'électrophotomètre	
	Avant évaporation	Après évaporation
100	29	40
200	42	64

Il est donc clair qu'au cours de l'évaporation à sec de la teinture acide, une substance colorée a pris naissance aux dépens d'un chromogène peu ou pas coloré. Nous verrons, au cours de notre travail, se préciser la nature de ce chromogène, et la façon dont il se transforme en substance colorée.

VI. — BILAN D'EXTRACTION

Notre procédé initial d'extraction consistait, nous l'avons vu, à faire macérer les pellicules brutes dans l'alcool à 95°, puis à distiller sous vide la teinture obtenue. L'extraction des substances colorées ainsi effectuée était-elle quantitative ? Non, car après ce traitement, le tégument séminal de l'Arachide restait encore coloré, même après huit jours de macération.

Afin de réaliser un épuisement aussi parfait que possible, nous avons substitué, à la macération, une lixiviation conduite selon les règles habituelles. En particulier, nous avons ajouté de l'alcool jusqu'à ce que ce solvant s'écoule parfaitement incolore du percolateur. Les avantages que présente la lixiviation sur la macération sont bien connus : l'épuisement est plus complet et plus rapide (vingt-quatre heures suffisent), et le terme de l'opération est facilement contrôlable.

Après ce traitement, les téguments sont sensiblement moins colorés que ceux traités par macération. Toutefois, le micros-

cope permet de déceler encore de nombreuses cellules de l'assise externe dont les vacuoles n'ont pas été vidées de leur contenu coloré. L'assise interne est encore teintée de jaune pâle.

Si l'on passe au moulin les pellicules délipidées et dépoussiérées, de façon à réduire les fragments de tégument en une poudre grossière, l'action dissolvante de l'alcool s'exerce plus rapidement, l'épuisement de la drogue est meilleur, mais non encore total.

Nous avons enfin tenté d'opérer l'extraction par l'alcool chaud, au moyen de l'appareil de KUMAGAWA. En vue d'éviter l'action nocive des substances acides qui pourraient être entraînées par le solvant, nous avons pris la précaution d'ajouter quelques pincées de carbonate de calcium; des billes de verre régularisent l'ébullition. Avant de mettre l'appareil en marche, on réalise un vide partiel, de telle façon que l'alcool entre en ébullition vers 50°. A cette température, et en milieu neutre, aucune transformation des substances colorées n'est à craindre, ainsi que nous avons pu le constater par comparaison avec les autres procédés d'épuisement. La liqueur alcoolique, privée du carbonate de calcium par filtration, est en tout point semblable à celle que l'on prépare par lixiviation. Mais cette fois-ci, les pellicules sont parfaitement épuisées et le microscope ne décèle aucune coloration résiduelle dans les vacuoles des cellules du tégument.

VII. — PROCÉDÉ DÉFINITIF D'EXTRACTION

Le procédé définitif d'extraction peut donc être ainsi résumé :

1° Délipidation des pellicules à l'appareil de MACHEBŒUF et FETHKE.
2° Dépoussiérage au tamis.
3° Broyage au moulin.
4° Epuisement par l'alcool à 95°, dans l'appareil de KUMAGAWA et SUTO, en présence de carbonate de calcium, et sous vide partiel.
5° Filtration de la teinture.
6° Distillation sous vide, jusqu'à obtention de l'extrait sec.

VIII. — RÉSULTATS QUANTITATIFS DE L'EXTRACTION

En passant successivement de la macération à la lixiviation puis à l'extraction par l'appareil de KUMAGAWA et SUTO, des

progrès sensibles dans le rendement ont été réalisés. Le tableau IV donne les différentes valeurs, exprimées en grammes, de l'extrait sec obtenu à partir de 100 g. de pellicules délipidées, dépoussiérées et broyées. On notera le gain de temps considérable que le troisième mode d'épuisement permet d'effectuer.

TABLEAU IV

Epuisement par ..	Macération	Lixiviation	Kumagawa
Durée	10 jours	24 heures	10 heures
Extrait sec pour 100 g. de pellicules	16,6	19,8	24,4

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Au cours de ce second chapitre, nous avons décrit les opérations préliminaires qui nous ont permis de faire le choix d'un solvant, l'alcool, et d'une méthode d'extraction, l'épuisement continu à l'appareil de KUMAGAWA et SUTO.

Après avoir reconnu la nécessité de délipider les pellicules avant tout autre traitement, nous avons montré comment, en opérant en milieu acide, on pouvait transformer certains constituants naturels en substances réagissant à la façon des anthocyanosides.

Quelques résultats quantitatifs ont été obtenus, en ce qui concerne le taux de lipides extractibles par l'éther à froid, au moyen de l'appareil de MACHEBŒUF et FETHKE, ainsi que le taux d'extrait sec représentant, outre les impuretés, tout ce que les pellicules renferment comme substances colorées.

CHAPITRE III

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES PIGMENTS DE LA CUTICULE DE L'ARACHIDE

I. — ÉTUDE DE L'EXTRAIT SEC OBTENU SELON LA MÉTHODE PRÉCÉDEMMENT EXPOSÉE

A. — Sa composition

On conçoit que l'extraction à l'alcool des cuticules préalablement épuisées à l'éther a peu de chances de fournir un produit pur. Le traitement par l'éther a privé le tégument de son huile et de quelques impuretés (essences, cires, acides organiques) qui pouvaient s'y trouver. L'alcool à 95°, agissant après l'éther, a pu se charger de nombreux glucides : hétérosides, tannosides, tannoïdes en général, holosides et oses simples. Il peut contenir également des catéchols, des phlobaphènes et des sels d'acides organiques.

On ne peut donc pas espérer trouver, dans cet extrait alcoolique, les substances colorées à l'état pur. Ces substances nous intéressant au premier chef et constituant l'objet de notre travail, nous donnerons le nom d' « impuretés » à tout ce qui vient les souiller lors de l'extraction, de l'isolement et de la purification. Il n'est toutefois pas attaché de signification péjorative à ce terme d' « impuretés » et nous sommes persuadé que l'étude de ces substances serait tout aussi intéressante que celle des pigments de la cuticule.

B. — Caractères organoleptiques

L'extrait sec se présente sous l'aspect d'une poudre amorphe, rouge-brunâtre, à reflets brillants, de faible densité, d'odeur rappelant celle de l'huile d'Arachide. Le caractère organoleptique le plus saillant est constitué par son goût fortement astringent : une trace de la poudre, déposée sur la langue, y produit une sensation caractéristique de plissage, fort analogue à celle que l'on ressent dans les mêmes conditions avec l'extrait sec de Ratanhia. On sait que le Ratanhia (*Krameria triandra* R.) est une Légumineuse originaire d'Amérique, utilisée en thérapeutique pour sa richesse en tanins. Cette saveur astringente, commune aux deux produits, nous a fait penser aussitôt à la présence de tanins dans notre extrait. Mais on ne saurait tirer de ce caractère rien de bien précis, tout au moins en ce qui concerne la nature du tanin et sa richesse dans l'extrait [155, 217].

C. — Caractères de solubilité

L'extrait sec se montre entièrement soluble dans l'alcool à 95° qui a servi à sa préparation. L'alcool méthylique, l'acétone anhydre le dissolvent aussi sans résidu. Si, à une solution concentrée de l'extrait dans l'alcool absolu, on ajoute quatre à cinq volumes d'éther anhydre, de chloroforme ou de benzène, un précipité apparaît : des flocons rougeâtres se forment et ne tardent pas à se rassembler au fond du récipient. Ce fait est très normal, puisque nous avons déjà remarqué, lors d'essais préliminaires, que ces trois solvants ne dissolvaient pas les pigments de la cuticule. Il devait pourtant nous conduire à identifier, dans l'extrait sec, une fraction nettement caractérisée par sa solubilité.

D. — Mise en évidence d'une fraction soluble dans l'éther

Dans un tube à essais, on introduit environ 10 cm^3 d'éther anhydre. En agitant le tube, on laisse tomber dans l'éther, goutte à goutte, un demi-centimètre cube d'une solution saturée de l'extrait sec dans l'alcool absolu. Un précipité floconneux apparaît et ne tarde pas à se déposer. L'éther surnageant ne se montre pas absolument incolore, mais très faiblement teinté de jaune. C'est tout à fait par hasard que nous avons remarqué cette coloration, qui peut fort bien passer inaperçue tellement

elle est pâle. Afin de vérifier qu'il s'agit bien d'une substance soluble dans l'éther, et non dans l'éther renfermant des traces d'alcool, nous avons filtré le contenu du tube et nous avons évaporé le filtrat jusqu'à sec. Le résidu, repris par l'éther anhydre, colore ce solvant en jaune pâle.

L'extrait sec se laisse donc diviser en deux fractions : la première, soluble dans l'éther; la seconde, insoluble dans l'éther.

II. — LA FRACTION SOLUBLE DANS L'ÉTHER

L'existence de cette fraction soluble dans l'éther pose un double problème :

Comment se fait-il que, lors des essais préliminaires, l'éther ne se soit pas coloré en jaune au contact des pellicules ?

Comment expliquer le fait que cette fraction ne soit pas éliminée lors de la délipidation par l'éther anhydre dans l'appareil de Machebœuf et Fethke ?

Cela est dû au fait qu'à froid, l'éther n'arrive pas à extraire cette fraction des téguments, que ce soit par macération ou par épuisement continu. Mais lorsqu'on utilise l'appareil de Kumagawa-Suto, où l'éther agit à son point d'ébullition, on extrait des pellicules la même substance jaune pâle; nous devons cependant préciser que cet épuisement s'avère très lent; cela nous a conduit à instaurer un procédé d'extraction plus satisfaisant.

A. — Procédé d'extraction

La fraction éthéro-soluble de l'extrait sec se montre également soluble dans le chloroforme : si l'on répète l'expérience initiale en substituant ce dernier solvant à l'éther, on obtient finalement le même résultat. Voici comment, à partir de l'extrait sec, nous pouvons obtenir dans des conditions satisfaisantes la fraction éthéro-soluble :

L'extrait est tout d'abord soigneusement privé des dernières traces d'alcool qu'il peut encore renfermer. Il est trituré avec son poids de sable blanc de Fontainebleau et la poudre obtenue est desséchée à 40°, sous grand vide, avant d'être introduite dans la cartouche filtrante d'un appareil de Kumagawa-Suto, où elle est épuisée par le chloroforme; le point d'ébullition de ce solvant étant beaucoup plus élevé que celui de l'éther, l'épuisement s'avère plus rapide. En quelques heures, le chloroforme se teinte en jaune. L'opération est poursuivie jusqu'à ce que le

solvant s'écoule incolore de la nacelle de l'appareil. Après filtration, la solution chloroformique est distillée au bain-marie. Le résidu, d'aspect huileux, présente une forte coloration jaune rougeâtre.

B. — Caractérisation de la substance extraite

La coloration jaune pâle caractéristique que prennent l'éther et le chloroforme au contact de l'extrait sec paraît devoir être attribuée à un composé flavonique. La solubilité dans l'éther et le chloroforme exclut d'emblée l'hypothèse d'un tannoïde. La meilleure confirmation de la nature flavonique de cette substance est fournie par son comportement en présence des alcalis : si l'on ajoute, en effet, quelques gouttes de lessive de soude diluée à la solution éthérée, la teinte jaune pâle vire aussitôt au jaune foncé très vif et la coloration se rassemble dans la phase aqueuse. Par retour en milieu acide, cette coloration disparaît.

Si l'on utilise une solution chloroformique, il s'avère facile d'extraire la substance au moyen d'un acide dilué. La couche acide, décantée, reste incolore, mais passe au jaune vif par alcalinisation. Dans les deux cas, les colorations obtenues en milieu alcalin se montrent remarquablement stables.

Il n'est guère besoin d'insister plus longtemps sur ce caractère fondamental des flavones, connu bien avant la nature chimique de ce groupe de pigments. Dès 1854, Filhol [58] remarque que des fleurs blanches, exposées aux vapeurs de gaz ammoniac, deviennent jaunes, et que la couleur jaune se trouve détruite par les acides. Après lui, bien des auteurs ont signalé ce fait [12, 139, 211] et l'ont toujours rapporté à la présence de dérivés de la phényl-benzo-γ-pyrone dans les tissus végétaux étudiés.

C. — Purification et cristallisation

Les dérivés flavoniques cristallisent en général facilement. De nombreux auteurs, tel Rabaté [162], signalent la cristallisation spontanée de certains flavonosides au sein de l'éther qui a servi à les extraire. En utilisant comme solvant l'éther saturé d'eau, il serait même fréquent de voir se déposer des cristaux de flavones dans le ballon de l'extracteur. Nous pensons que des cristallisations se produisant avec une telle facilité ne peuvent être obtenues qu'à partir de tissus végétaux extrêmement riches en flavones et extrêmement pauvres en

substances voisines par leur solubilité. Nous avons éprouvé quelques difficultés à faire cristalliser le composé flavonique de l'Arachide, car ce composé n'existe qu'à l'état de traces dans le tégument: il s'y trouve mêlé à de nombreuses substances présentant avec lui des caractères communs de solubilité. Nous avons été gêné en particulier par la présence de lipides que l'éther n'avait pu éliminer à froid dans l'appareil de Machebœuf et Fethke, mais qu'il dissout fort bien à chaud, dans l'appareil de Kumagawa-Suto. Le chloroforme, lui aussi, extrait des lipides que l'éther avait respectés [181]. La technique de purification que nous avons finalement mise au point repose sur la solubilité des flavones dans les acides minéraux dilués, ce qui permet d'éliminer les lipides et autres impuretés. De sa solution acide, la flavone passe facilement dans l'éther, surtout si l'on prend soin d'ajouter des traces d'alcool à la phase aqueuse.

Le résidu d'évaporation du chloroforme, qui constitue la fraction éthéro-soluble décrite plus haut, est donc repris par l'acide sulfurique décinormal. La solution acide est filtrée. On y ajoute le vingtième de son volume d'alcool à 95°, et on l'extrait à plusieurs reprises avec de l'éther, dans une ampoule à décantation. On réunit les fractions éthérées et on les évapore au bain-marie. On obtient ainsi un résidu que l'on reprend par un petit volume d'acide sulfurique 0,05 N, et que l'on épuise à nouveau par l'éther, dans les mêmes conditions. L'éther est séché sur du sulfate de sodium anhydre récemment calciné; il est filtré puis évaporé. Le résidu se présente sous l'aspect d'un liquide sirupeux jaune foncé que l'on dilue dans une faible portion d'acétone anhydre. La solution ainsi obtenue, filtrée sur un minuscule filtre en verre d'Iéna, est abandonnée à l'évaporation, dans un endroit frais, à l'abri des heurts et de la poussière. Après quelques jours, la flavone cristallise en fines aiguilles isolées ou groupées en oursins.

D. — Recherche du chromogène dans la fraction éthéro-soluble

Ne serait-il pas possible de retrouver, dans la fraction éthéro-soluble, le chromogène mis en évidence au chapitre précédent ? La vérification paraît facile à effectuer : nous avons traité à l'ébullition par l'acide chlorhydrique à 15 p. 100 le résidu insoluble dans l'acide sulfurique décinormal, puis la solution acide privée de la flavone par l'éther, enfin la flavone elle-

même. Aucune coloration rouge ne se développe dans les conditions fixées par Robinson [171, 173], c'est-à-dire entre trente secondes et deux minutes d'ébullition. Signalons toutefois qu'en prolongeant l'ébullition au delà de cinq minutes, nous avons observé dans le premier cas la production d'une coloration rose; celle-ci est due à la présence de catéchols. Etti [54] a signalé depuis longtemps l'apparition de cette coloration chaque fois que l'on porte à l'ébullition une solution aqueuse de catéchine; elle serait due, selon cet auteur, à une polymérisation s'accompagnant du départ d'une molécule d'eau entre deux molécules de catéchine.

On peut donc conclure de ces divers essais que le chromogène, insoluble dans l'éther et le chloroforme, ne se trouve pas dans la fraction flavonique des pigments de la cuticule.

III. — LA FRACTION INSOLUBLE DANS L'ÉTHER

Cette fraction renferme au moins deux constituants :

Le chromogène, peu ou pas coloré, que nous n'avons pu déceler dans la fraction éthéro-soluble;

Une substance fortement colorée en rouge foncé, qui communique à l'extrait sec la coloration caractéristique signalée au chapitre précédent.

La saveur fortement astringente que présente la fraction insoluble dans l'éther est-elle due à l'un de ces constituants, aux deux à la fois, ou bien à un tannoïde distinct ? Nous ne pouvons encore répondre à cette question.

Parmi les impuretés ayant résisté à l'action dissolvante de l'éther ou du chloroforme, nous pourrons rencontrer des glucides, en particulier du saccharose, dont la présence dans la graine d'Arachide a été signalée par Pieraerts et Tanret [156].

C'est finalement grâce à l'adsorption chromatographique que nous avons pu, après de nombreux essais, scinder ce mélange d'apparence très complexe en ses divers constituants.

A. — Analyse chromatographique de la fraction insoluble dans l'éther

La chromatographie constitue la méthode de choix pour l'étude des pigments végétaux. Nous ne ferons que citer les travaux de Karrer et Strong [124], Karrer et Weber [87]

sur les anthocyanosides, et ceux de ZECHMEISTER et CHOLNOKY [223], KOSCHARA [93], KARRER et WALKER [86] sur les chlorophylles et les carbures caroténoïdes, qui tous ont abouti à l'isolement de nombreux composés chimiques très voisins, existant côte à côte dans les tissus végétaux, et dont l'individualité n'avait pu être mise en lumière par les méthodes analytiques habituelles.

Les tannoïdes, eux aussi, ont bénéficié de cette technique, et de bons résultats ont été obtenus, principalement dans l'analyse des matières tannantes industrielles. C'est dire qu'en utilisant la chromatographie, nous avions quelque espoir de réussir à identifier les différents constituants de la fraction insoluble dans l'éther. Cet espoir ne fut pas déçu, mais après de très longs tâtonnements. La chromatographie manque encore, à notre avis, de bases théoriques solides (il suffit pour s'en convaincre de lire les ouvrages récents traitant de la question [124]), et ses méthodes restent parfois très empiriques. De plus, il est malheureusement impossible pour le moment de se procurer, en France, la gamme des adsorbants utilisés de façon courante dans les laboratoires étrangers.

a) *Matériel utilisé.* — Nous avons utilisé comme adsorbant l'alumine pour chromatographie de Prolabo.

La colonne est constituée par un tube de verre de 8 millimètres de diamètre intérieur, de 15 centimètres de long, étiré à son extrémité inférieure, et évasé en entonnoir à son extrémité supérieure.

Un tampon de laine de verre est introduit dans la partie rétrécie du tube, puis l'alumine est versée par petites portions. La meilleure façon d'obtenir une répartition uniforme de l'alumine consiste à frapper le tube de petits coups répétés, avec l'extrémité des doigts. On suit ainsi la montée du niveau de l'absorbant. Il est commode de maintenir le tube vertical au moyen d'un support de burette. Lorsque la hauteur de la colonne est jugée suffisante, on dépose sur la surface de l'alumine un petit tampon de laine de verre, destiné à maintenir cette surface dans son intégrité lors de l'addition des différentes solutions.

FIG. 6.

Pour recueillir séparément les diverses fractions en cours d'élution, nous avons utilisé un manchon de verre épais, fermé par deux bouchons de caoutchouc. Entre les deux bouchons se trouve ménagé un espace suffisant pour l'introduction d'un tube à essais. Le bouchon supérieur, percé d'un trou central, supporte la colonne. Le bouchon inférieur, percé d'un trou situé au tiers du diamètre, laisse passer un tube à robinet à deux voies, dont l'une est en communication avec la trompe à eau, et l'autre, avec l'air extérieur.

Le manchon de verre est soutenu au moyen d'un support universel. Il s'avère facile, grâce à cet appareil, de recueillir avec rapidité et précision les différentes fractions du chromatogramme. Le matériel servant à la chromatographie doit être rigoureusement propre. Les tubes destinés à contenir l'alumine, la laine de verre et toute la verrerie en général sont lavés au mélange sulfochromique chaud, rincés à l'eau distillée et séchés à 120°.

b) *Résultats.* — Nous n'insisterons pas sur les tâtonnements qui ont précédé la découverte d'un éluant convenable; la fraction étudiée n'étant soluble que dans l'alcool ou l'acétone, nous étions placé dans les conditions les moins favorables pour réaliser une bonne adsorption. En effet, l'alcool, surtout dilué, et l'acétone sont considérés comme de bons éluants, mais comme de médiocres solvants pour chromatographie. Toutefois, en opérant avec un faible volume de solution alcoolique, la totalité des substances colorées se fixe en tête de la colonne, et l'alcool s'écoule incolore.

Mais lorsque nous avons essayé de développer le disque coloré ainsi obtenu, aucun des éluants habituellement utilisés n'eut sur lui la moindre action. Ce n'est qu'avec les solutions salines qu'un résultat fut obtenu. Avec une solution de phosphate monosodique à 10 p. 100, un anneau jaune se sépare du disque rouge, et vient se fixer à quelques millimètres au-dessous. Avec une solution de chlorure de sodium de même concentration, l'anneau descend peu à peu, et si l'on augmente la concentration de la solution saline, on parvient à éluer une fraction colorée en jaune pâle. L'élution est réalisée dans les meilleures conditions en employant une solution saturée de chlorure de sodium.

c) *Conclusions.* — La chromatographie permet de scinder la fraction insoluble dans l'éther (que nous désignerons dès

maintenant par les initiales F. I.) en deux sous-fractions, f 1 et f 2 :

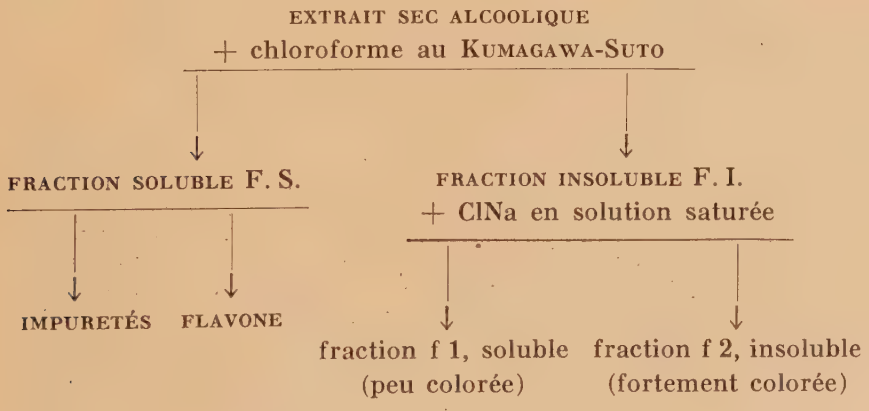
f 1, coloration jaune pâle, éluée par le chlorure de sodium en solution aqueuse saturée;

f 2, coloration rouge brunâtre, reste en tête de colonne.

L'intérêt de cette opération se trouve encore accru par le fait suivant : en opérant, non plus par chromatographie, mais selon une méthode moins délicate et beaucoup plus rapide, on peut arriver à scinder de la même façon la fraction F. I. Nous avons pu vérifier que si l'on triture au mortier une certaine quantité de la fraction F. I. en présence d'une solution saturée de chlorure de sodium, et que l'on filtre, on obtient un filtrat coloré en jaune pâle, présentant tous les caractères de la fraction f 1 du chromatogramme; quant au résidu insoluble, il repasse facilement en solution dans l'alcool, et s'identifie à la fraction f 2.

On peut donc dès maintenant entreprendre l'étude de ces deux fractions, l'une, soluble dans l'eau saturée de chlorure de sodium, l'autre, insoluble dans les mêmes conditions.

Nous résumerons en un tableau schématique ces principales opérations :



B. — FRACTION f 1 : LE CHROMOGÈNE

L'identité de la fraction f 1 avec le chromogène se montre facile à établir. Que l'on opère sur la solution provenant de l'élution du chromatogramme, ou sur le filtrat résultant de la

trituration de la fraction F. I. avec la solution chlorurée, on observe la même réaction caractéristique de la présence du chromogène.

Ce dernier peut être mis en évidence de la façon suivante : un certain volume de la liqueur saturée de chlorure de sodium est étendu de moitié avec de l'eau distillée. On ajoute alors une quantité calculée d'acide chlorhydrique pur pour amener le titre final à 15 p. 100 en poids. La dilution préalable de la liqueur renfermant le chromogène est rendue nécessaire par son état de saturation en chlorure de sodium, substance homoïonique à l'acide chlorhydrique, qui précipiterait à la moindre addition d'ions Cl^-.

La solution, diluée et acidifiée, est portée à l'ébullition. Au bout de trente secondes apparaît une coloration rouge cerise très vive, n'ayant rien de commun avec la teinte rouge brunâtre décrite jusqu'ici à propos des solutions alcooliques de l'extrait sec. L'apparition de cette coloration rouge est rendue très sensible par le fait qu'elle se produit au sein d'une solution presque incolore.

Nous étudierons, dans un des chapitres suivants, les propriétés chimiques de ce chromogène. Dès maintenant, nous pouvons en assurer l'identité avec le composé de nature anthocyanique décrit par Tayeau [197], car nous avons obtenu par neutralisation de la solution acide refroidie les virages de teinte déjà remarqués par cet auteur.

C. — Fraction f 2 : le tannoïde

Lorsque l'on a trituré la fraction F. I. avec la solution saturée de chlorure de sodium, il reste, après filtration, un produit rougeâtre qui colmate le filtre. On récupère cette substance et on la triture à nouveau en présence de la même solution saline. On centrifuge. On obtient ainsi un culot rougeâtre surmonté d'un liquide qui est encore faiblement teinté de jaune. Afin d'éliminer toute trace de la fraction f 1, en même temps que les impuretés résiduelles (telles que : oses, sels d'acides organiques, etc...), on répète le lavage une seconde et une troisième fois, en opérant dans le tube de la centrifugeuse. Finalement, le culot est recueilli et séché entre des feuilles de papier filtre. On chasse les dernières traces d'humidité en plaçant le produit, étalé en couche mince dans un dessiccateur, en présence d'anhydride phosphorique. Après un séjour de quarante-huit heures au dessiccateur, la substance

rougeâtre devient pulvérulente et renferme de nombreux petits cristaux de chlorure de sodium. On l'épuise par l'acétone anhydre, ce qui permet d'éliminer le sel. Après filtration et évaporation du filtrat, on obtient la fraction f 2 pratiquement privée de chlorure. Cette fraction se présente à peu près sous le même aspect que l'extrait sec décrit au début de ce chapitre. Elle en a conservé la saveur fortement astringente.

a) *Caractères de solubilité.* — La fraction f 2, comme nous le savons déjà, se montre soluble dans l'alcool fort et l'acétone; elle est insoluble dans l'éther, le chloroforme, le benzène.

Un fait intéressant doit être signalé : sa parfaite solubilité dans l'acétate d'éthyle.

Lorsqu'on la triture dans l'eau distillée, elle se dissout partiellement, abandonnant des grumeaux brunâtres. Si l'on porte l'eau à l'ébullition, la dissolution devient presque totale. Mais, par refroidissement, des flocons se déposent. Même en utilisant l'eau froide, la solution rougeâtre obtenue par filtration ne demeure pas limpide : un précipité floconneux apparaît après quelques heures.

b) *Identification d'un tannoïde.* — De nombreux chercheurs, Perkin, Sisley, Fischer, Freudenberg, Bergmann, Karrer, Robinson, Nierenstein, pour ne citer que les plus connus, se sont penchés avec intérêt sur la chimie des tanins. Et pourtant, selon l'expression imagée de Nierenstein [133], grand spécialiste de la question, ces substances constituent en quelque sorte le « continent noir » de la chimie organique, continent peu exploré, où l'on ne s'aventure pas sans danger.

Les tanins possèdent quelques caractères fondamentaux parfaitement résumés dans les lignes suivantes que nous empruntons à Nierenstein [133] :

« The Tannins are amorphous, rarely crystalline substances which are widely distributed in the vegetable kingdom. They are remarkable for their astringent taste, and for their ability to form coloured solutions and precipitates with iron and other metals. They are also precipitated from solution by albumin, gelatin, and other proteins, as well as by alkaloids. Their ability to combine with proteins is the basis of the process known as vegetable tannage, by which animal fibre is converted into leather. »

Les propriétés astringentes des tanins sont bien connues.

Etudiées au point de vue technique par Wilson [217], elles ont permis à cet auteur de démontrer que la rapidité du tannage est sous leur dépendance. Plus un tanin est astringent, mieux et plus vite il transforme les peaux en cuir.

Les colorations fournies avec les sels de fer sont, de même, connues depuis l'antiquité, et l'encre fabriquée avec des noix de galle était encore utilisée au début de ce siècle. Aux sels de fer, on a substitué les sels de cuivre (Bonifazi et Capt [20], Dott [52]), les sels de zinc (Carpeni [205], Hough [79]), les sels de chrome (Boswell [22], Peters [153], Hampton-Hoch [74]) et ces différents métaux ont permis de doser les tanins ou de les localiser au sein des cellules végétales.

Les alcaloïdes ont été utilisés dans le même but : la quinine par Tatlock et Thompson [196], et par Chapman [32], la cinchonine par Kapeller [84], la caféine et la strychnine par Fear [57].

Mais la fixation des tanins sur les protéides constitue le caractère le plus spécifique et vraiment fondamental de ce groupe de substances. Gustavson [72] a montré comment les tanins se fixent d'une façon rapide et irréversible sur les groupements ioniques basiques du collagène, et transforment ce collagène en un produit stable à l'eau et à la chaleur, le cuir.

On a successivement utilisé : la poudre de peau (Thuau [203], Chambard [31], Allen [1], Barnell [13]), la caséine (Nierenstein [131]), la gélatine (Nierenstein [134, 135]), certains polypeptides (Nierenstein et Tryon [136]), soit pour déceler les tanins, soit pour les doser par différence, en les extrayant d'un mélange complexe. Des méthodes internationales de dosages, rendues officielles dans l'industrie du cuir, utilisent cette propriété caractéristique des tanins.

De tout ce qui précède, on peut tirer la conclusion pratique suivante : lorsqu'une substance organique d'origine végétale, mise en solution, présente les caractères suivants :

— saveur astringente,
— coloration avec les sels de fer, de cuivre et de chrome,
— précipitation par les alcaloïdes,
— fixation aux protéides,

et lorsque, ayant fait agir un protéide sur la solution de cette substance et ayant filtré, le filtrat obtenu ne présente plus aucun des caractères précités, on peut affirmer que l'on se trouve en présence d'un *tanin* ou, pour nous conformer à la terminologie actuelle, d'un *tannoïde*.

Or, c'est exactement ce qui se produit lorsque nous traitons de la même façon une solution aqueuse de la fraction f 2. Nous insisterons plus longuement sur les différentes réactions propres à cette fraction au cours du chapitre VI. Disons cependant qu'après action de la gélatine, le filtrat ne présente aucune propriété décrite à propos de la fraction f 2 : le filtrat s'écoule incolore et limpide, il n'est plus astringent et ne donne plus une seule réaction des tannoïdes.

On peut démontrer facilement que la fraction f 2 ne renferme que le tannoïde : il suffit de répéter les expériences précédentes, non plus sur une solution aqueuse froide, mais sur une solution obtenue avec de l'eau bouillante, qui dissout pratiquement tout le produit. Après l'action du protéide, on obtient un filtrat identique au précédent.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

De l'extrait sec représentant la totalité des substances colorées du tégument de l'Arachide, nous avons isolé successivement :

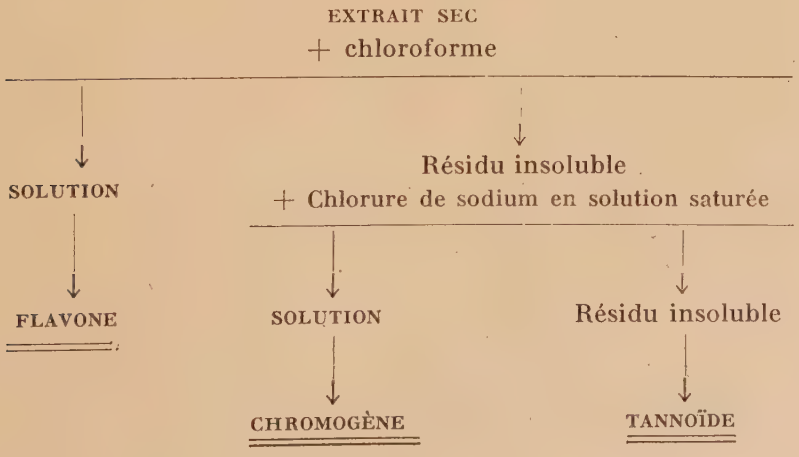
1° Une fraction soluble dans l'éther et le chloroforme, dans laquelle nous avons caractérisé une substance chimique du groupe des *Flavones*.

2° Une fraction insoluble dans l'éther et chloroforme. Cette fraction, soumise à l'adsorption chromatographique, s'est scindée en deux parties :

— l'une, peu colorée, renfermant un *chromogène;*

— l'autre, très colorée, renfermant un *tannoïde*.

Le schéma suivant résume ces différents résultats :



CHAPITRE IV

ÉTUDE DE LA FLAVONE

I. — EXTRACTION

Nous avons décrit au chapitre précédent une méthode permettant d'extraire l'ensemble des matières colorées du tégument de l'Arachide. Parmi ces substances, nous avons caractérisé et isolé un composé flavonique, grâce à sa solubilité spécifique dans certains solvants.

A. — Choix du solvant

L'alcool est fréquemment utilisé pour l'extraction des flavones (Charaux [33], Bridel [27], Rabaté [160, 162, 163], Naghski [129], Nakamura [130]). Certains auteurs cependant préconisent l'acétone (Guthrie [73]) ou encore l'acide formique dilué (Bancroff et Rutzler [12, 178]). Aucun de ces solvants ne nous convient, car tous dissolvent à la fois la flavone et le tannoïde. L'eau est également à rejeter, car elle dissout le chromogène. Notre choix se limite donc aux deux solvants déjà utilisés, l'éther et le chloroforme. Des essais préliminaires nous ont fait préférer le chloroforme qui se charge plus rapidement de la flavone; finalement, nous nous sommes arrêté au mélange suivant : chloroforme 9 volumes, alcool absolu 1 volume, dans lequel l'alcool accroît le pouvoir solvant du chloroforme, tandis que ce dernier inhibe le pouvoir solvant de l'alcool envers le tannoïde.

B. — Technique de l'extraction

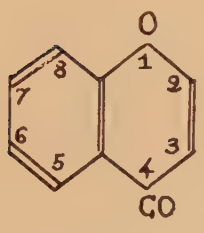
Les pellicules délipidées et broyées sont épuisées à l'appareil de Kumagawa-Suto par le mélange alcool-chloroforme. Le

liquide extractif jaune pâle est recueilli puis évaporé sous vide jusqu'au dixième de son volume initial. Le résidu est agité à trois reprises avec un égal volume d'acide sulfurique décinormal. Les liqueurs acides réunies sont filtrées et épuisées par un demi-volume d'éther. Cet épuisement est renouvelé trois fois. Après évaporation de l'éther, le résidu est repris par 20 cm^3 d'acide sulfurique décinormal. Après filtration de la solution obtenue, un nouvel épuisement à l'éther dans les conditions fixées plus haut est effectué. L'éther, desséché sur du sulfate de sodium récemment calciné, est filtré puis évaporé à sec. Le résidu est lavé avec quelques cm^3 de benzène et finalement dissous dans un petit volume d'acétone anhydre. Par évaporation lente dans un endroit frais, l'acétone laisse déposer des cristaux de flavone. Rendement : 100 g. de pellicules délipidées ont fourni : 0,02 g. de produit cristallisé.

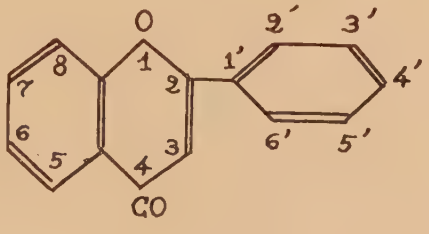
II. — CARACTÉRISATION D'UNE FLAVANNONE

A. — La chimie des pigments flavoniques

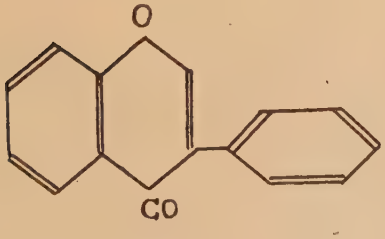
Les pigments végétaux connus sous le nom de flavones dérivent tous de la γ benzopyrone ou *chromone*, par substitution, au niveau des carbones 2 ou 3, d'un cycle benzénique à un atome d'hydrogène. La phényl 2 chromone constitue la flavone proprement dite, l'isoflavone étant la phényl 3 chromone.



Chromone.



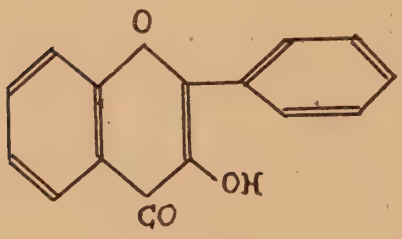
Flavone.



Isoflavone.

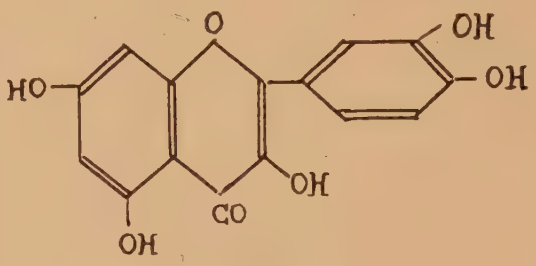
Flavone et isoflavone sont incolores, mais la substitution d'un hydroxyle dans le noyau pyronique apporte la coloration jaune caractéristique des pigments naturels et transforme la flavone en flavonol. Les deux cycles benzéniques

sont fréquemment pourvus d'hydroxyles, le flavonol devient un hydroxy-flavonol. Le quercétol, présent dans de nombreuses plantes, est le 5.7.3'.4' tétrahydroxyflavonol.



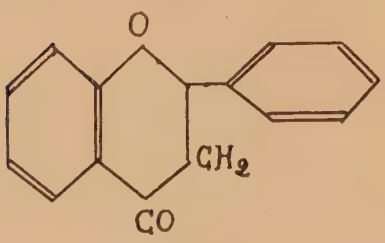
Flavonol.

Un second groupe de pigments flavoniques dérive non plus de la flavone, mais de la flavannone, dans laquelle la double liaison du cycle pyronique est saturée. La flavannone est incolore; comme pour la flavone, ses dérivés hydroxylés sont des pigments jaunes. Ainsi, l'ériodictyol de l'écorce du citron est la 5.7.3'4' tétrahydroxyflavannone.



Quercétol.

Les pigments flavoniques se rencontrent tantôt à l'état libre, tantôt sous forme d'hétérosides. Dans ce dernier cas, l'ose est fixé en position 3 chez les flavonols, en position 7 ou plus rarement 5 chez les flavannones.



Flavannone.

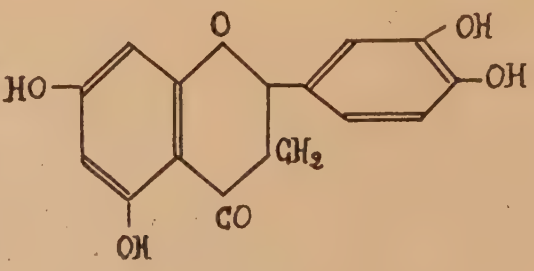
B. — Le pigment de l'arachide est une flavannone

Nous fondons cette affirmation sur les trois faits suivants :

1° Ce pigment donne une réaction de Wilson négative.

2° Par réduction, il ne se transforme pas en anthocyanidol.

3° Son spectre d'absorption en lumière ultra-violette est celui d'une flavannone.



Eriodictyol.

Voyons en détail la valeur respective de chacun de ces trois arguments.

a) *Réaction de Wilson*

Wilson [216] a remarqué la production d'une coloration jaune très intense en faisant agir l'acide borique sur la grande majorité des flavonols. Les flavannones, et de rares flavonols, ne donnent pas cette coloration.

Le réactif est un mélange à parties égales de deux solutions saturées d'acide borique et d'acide citrique dans l'acétone anhydre. L'acide citrique doit être desséché avant sa dissolution.

La réaction s'opère sur un demi-milligramme environ du dérivé flavonique, dissous dans 1 cm^3 d'acétone anhydre. On ajoute à cette solution 2 cm^3 du réactif de Wilson.

Résultat. — Forte coloration jaune : réaction positive. Aucun changement de coloration : réaction négative.

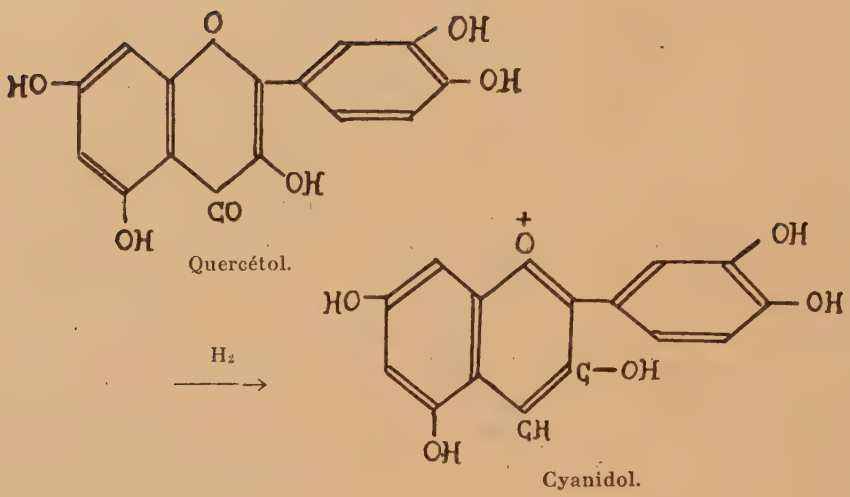
Conclusions. — Selon Wilson, une réaction positive permet de conclure à la présence d'un flavonol. Une réaction négative peut être due soit à une flavannone, soit à un flavonol ne portant pas d'hydroxyle en position 5.

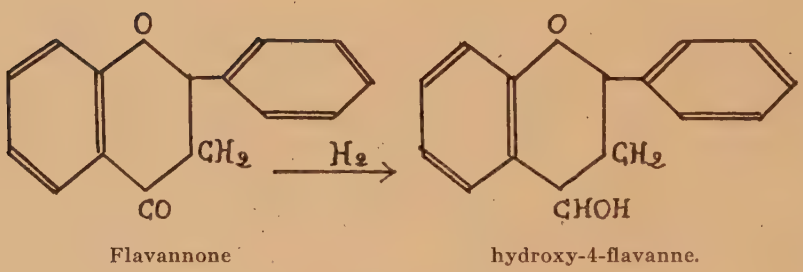
Le pigment de l'Arachide ne donne aucune coloration avec le réactif de Wilson. Ce fait est favorable à notre affirmation, mais ne constitue pas une preuve à lui seul.

b) *Action des agents réducteurs*

Les agents réducteurs ont été utilisés par de nombreux auteurs dans le but d'identifier les pigments flavoniques en les transformant en composés anthocyaniques caractéristiques. Les travaux de Willstatter [215] sur le quercétol sont devenus classiques. Nous citerons également les recherches effectuées par Combes [42], Everest [56], Rabaté [162] et Bancroft [11]. La réduction s'opère généralement en milieu alcoolique et acide au moyen du zinc granulé ou de magnésium en ruban ou bien encore d'amalgame de sodium ou de magnésium. Dans ces conditions, le quercétol se transforme en cyanidol, et les hétérosides flavoniques en anthocyanosides.

Cette transformation se conçoit aisément lorsqu'elle s'opère sur un flavonol. Les flavannones, qui ne possèdent pas d'hydroxyle en position 3, ne donnent pas d'anthocyanidol par réduction, mais un dérivé de l'hydroxy-4-flavanne.





Flavannone — hydroxy-4-flavanne.

Que penser des quelques auteurs qui signalent la production d'anthocyanidol par réduction de flavones et même de flavannones [5, 154, 193] ? Ils ont dû certainement opérer sur des substances mal purifiées et souillées de traces de flavonols ou encore, comme le signale Rabaté [163], transformer des impuretés tanniques en composés colorés en rouge qu'ils ont assimilés au cyanidol. Cette explication est très vraisemblable, car les réductions se font en milieu acide, et il suffit de laisser s'échauffer le liquide en réaction pour obtenir de telles transformations.

Expériences personnelles. — Nous avons utilisé comme agent réducteur l'hydrogène produit par l'électrolyse d'une solution de flavone dans l'acide sulfurique dilué. Nous avons construit un petit appareil représenté ci-contre qui nous a donné

d'excellents résultats. C'est un flacon à deux tubulures, d'une contenance de 100 cm³. Par la tubulure inférieure, un joint étanche laisse passer un fil conducteur relié au pôle négatif d'une source de courant continu. Le fond du flacon est garni de mercure, qui tient lieu de cathode. La solution du pigment dans l'acide sulfurique dilué surnage le mercure. Par la tubulure supérieure arrive l'anode, constituée par une feuille de platine plongeant à peine dans le liquide. La dissymétrie des électrodes favorise le contact du pigment avec l'hydrogène qui se dégage de la surface du mercure, tandis que l'oxygène s'échappe dans l'atmosphère dès sa formation. Nous dissolvons le pigment dans 50 cm³ d'acide sulfurique molaire et nous le soumettons à la réduction pendant une heure environ. Pour éviter l'échauffement du liquide, nous faisons plonger l'appareil dans un cristallisoir rempli d'eau froide.

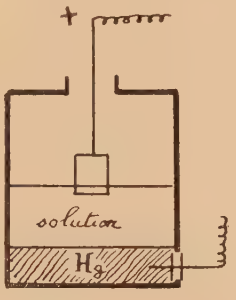


Fig. 7.

Résultats. — Avec le quercétol, que nous avons extrait de l'écorce de Quercitron selon la méthode de Thomas [202], nous avons obtenu très facilement du cyanidol : après quelques minutes de réduction, la solution était déjà teintée de rouge. La coloration rouge devient très intense après un quart d'heure d'hydrolyse. Nous avons vérifié que l'alcool amylique extrait en totalité la substance colorée de la solution acide.

Avec le Naringétol, flavannone que nous avons préparée selon la technique de Rabaté [162] à partir des écorces sèches du fruit de Pamplemoussier, nous n'avons pu obtenir la moindre trace d'anthocyanidol, même en prolongeant au delà d'une heure la durée de la réduction.

Le pigment flavonique de l'Arachide se comporte comme le Naringétol, c'est-à-dire comme une flavannone : sa réduction ne fait apparaître aucune coloration rouge, la solution conservant sa teinte jaune primitive. Nous pouvons donc conclure de nos expériences que ce pigment est très certainement une flavannone, et qu'il n'est souillé par aucune impureté du groupe des flavonols.

c) *Etude du spectre d'absorption en lumière ultra-violette*

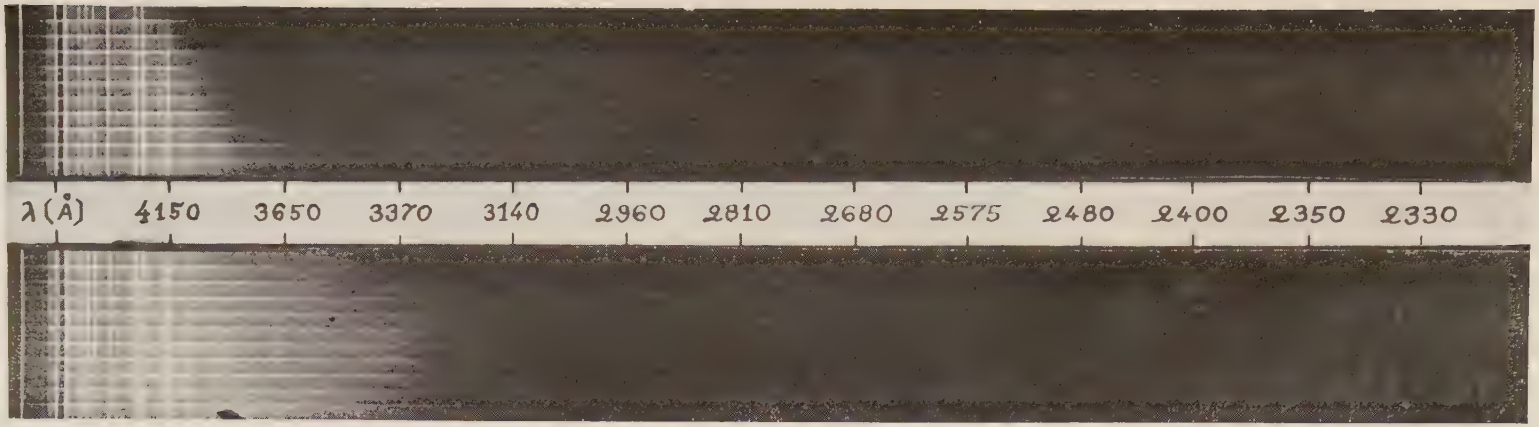
Nous avons voulu confirmer par une technique physique les résultats obtenus précédemment grâce à des méthodes chimiques. Nous avons choisi dans ce but l'étude du spectre d'absorption en lumière ultra-violette du dérivé flavonique de l'Arachide. Notre intention ne se bornait pas uniquement à préciser la structure chimique de ce composé, car nous avions l'espoir de déceler, par ce procédé, la nature des substitutions oxygénées fixées sur les cycles benzéniques latéraux.

Les travaux antérieurs de Skarzynski [192] ont grandement facilité notre tâche. Cet auteur a dressé un catalogue très complet des spectres d'absorption en lumière ultra-violette des dérivés flavoniques. Il a reconnu la présence constante de deux bandes d'absorption, l'une dans l'ultra-violet, proche de la lumière visible (2.900 - 3.800 Å), l'autre dans l'ultra-violet lointain. Ces deux bandes d'absorption caractérisent le noyau de la benzo-γ-pyrone et de ses dérivés phénylés.

α. *Mode opératoire.* — Nous avons utilisé comme source de lumière ultra-violette un tube de Challonge irradiant une cuve à épaisseur variable placée devant la fente d'un spectrographe de Fery. Les substances étudiées, purifiées par recristallisation, étaient dissoutes dans l'alcool à 95°, de façon à obtenir une concentration de 5 p. 1.000. Des spectres préliminaires nous avaient montré que cette concentration fournissait la meilleure absorption.

β. *Etude qualitative.* — Nous avons pris onze spectres en échelons du quercétol et de notre substance, en faisant varier l'épaisseur de la cuve selon une progression géométrique, le temps de pose étant constant. Nous avons pu connaître ainsi l'allure des courbes spectrophotométriques.

Evidemment, la localisation des maxima n'était que très approchée et, pratiquement, seul le maximum situé le plus près du visible pouvait être déterminé avec quelque précision. Un simple coup d'œil sur les deux séries de spectres suffit à montrer que le premier maximum se place à des longueurs d'onde bien différentes pour le quercétol et pour notre substance. Le spectre du quercérol présente un maximum entre 3.800 et 3.900 Å, tandis que pour la flavone de l'Arachide, la localisation, bien que moins nette, se fait entre 3.100 et 3.300 Å,



En haut : spectres en échelons. Quercétol, solution à 5 p. 1.000 dans l'alcool à 95°.
En bas : spectres en échelons. Flavannone de l'Arachide, solution à 5 p. 1.000 dans l'alcool à 95°.

En abcisses : longueurs d'onde en angströms.
En ordonnées : épaisseurs croissantes.

Skarzynski [192] donne les valeurs suivantes :

Quercétol	1er Max.	3.820 Å
Flavannone	—	3.200 Å

γ. Courbe d'absorption. — Les spectres en échelons ayant montré que la flavone de l'Arachide s'avérait très différente du quercétol, nous avons cherché à établir de façon précise la courbe d'absorption de notre substance. Nous avons opéré selon le procédé classique consistant à prendre des spectres de la substance sous des épaisseurs variables avec un temps de pose constant, et des spectres du solvant sous épaisseur contante avec des temps de pose variables. Nous avons interprété ces spectres au microphotomètre de Hilger (*) qui nous a permis de déterminer les valeurs du coefficient d'extinction K.

Dans son mémoire, Skarzynski donne pour la flavannone les caractéristiques suivantes :

Premier maximum = 3.200 Å	log. K =	3.34
Premier minimum = 2.800—	— =	2.68
Second maximum = 2.520—	— =	3.84

De notre côté, nous trouvons pour la flavone de l'Arachide :

Premier maximum = 3.200 Å	log. K =	3.28
Premier minimum = 2.800—	— =	2.75
Second maximum. = 2.580—	— =	3.58

Conclusions

1° Le pigment de l'Arachide n'est certainement pas un flavonol, les spectres préliminaires en échelons suffisent à le prouver.

2° Il s'agit bien d'une flavannone, car la courbe d'absorption construite d'après nos déterminations se montre pratiquement superposable à celle de Skarzynski.

3° Cette flavannone possède des substitutions

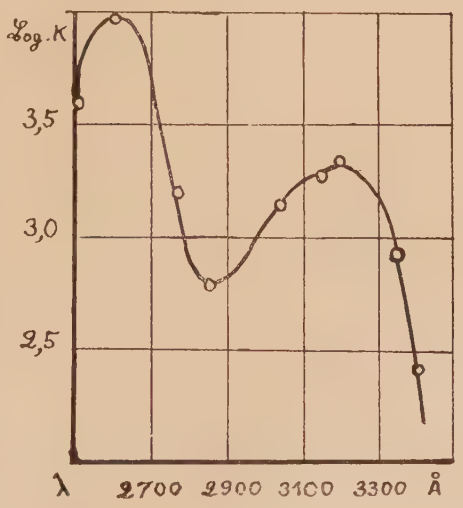


Fig. 8.

(*) Cet appareil a été mis gracieusement à notre disposition par M. Rousset, Professeur de Physique à la Faculté des Sciences de Bordeaux, à qui nous adressons nos bien vifs remerciements.

oxygénées dans les cycles benzéniques, puisqu'elle présente une coloration jaune (la flavannone non substituée est en effet incolore). La courbe d'absorption permet d'affirmer qu'il s'agit de fonctions simplement hydroxylées et non pas méthoxylées, tout au moins en tenant compte de nos conditions d'extraction : Skarzynski a démontré que la méthoxylation entraîne un décalage extrêmement net des bandes d'absorption de la flavannone. A ce propos, nous croyons pouvoir rattacher les faibles divergences existant entre les valeurs du coefficient K données par Skarzynski et les nôtres, au fait que l'auteur allemand a travaillé sur de la flavannone pure, alors que notre substance est une hydroxyflavannone.

III. — PROPRIÉTÉS

La flavannone n'existe qu'à l'état de traces dans le tégument de l'Arachide : le rendement en produit cristallisé atteint à peine 1 p. 5.000. La rareté actuelle des solvants organiques nécessaires à l'extraction ne nous a pas permis de traiter de grandes quantités de pellicules. Pour ces raisons, nos essais se sont bornés aux quelques réactions qualitatives que nous venons de décrire. Nous avons consacré le reste de notre stock de flavannone, soit quelques milligrammes, d'une part à la détermination du point de fusion et du pouvoir réducteur, d'autre part à une étude des propriétés physiologiques de ce produit, que l'on trouvera exposée dans la seconde partie de notre travail.

A. — Point de fusion

Nous avons déterminé le point de fusion de la flavannone en notant au microscope polarisant la température à laquelle se sont liquéfiés quelques micro-cristaux du produit pur. Le produit, déposé sur une lame de verre, est chauffé au bloc Maquenne. Des examens microscopiques fréquents et réguliers entre nicols croisés permettent de noter la persistance de l'état solide. Nous avons pu, en opérant selon cette méthode, situer le point de fusion aux environs de 250°, sans prétendre à une précision supérieure à ± 5°. Ce point de fusion très élevé paraît en accord avec les chiffres publiés au sujet des flavannones : l'ériodictyol fond à 267°, l'homoériodictyol à 223°.

B. — Pouvoir réducteur

La flavannone ne réduit pas la liqueur de Fehling. Après hydrolyse acide, elle ne donne naissance à aucune substance réductrice. Elle ne possède donc pas la structure hétérosidique,

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Une substance appartenant au groupe des pigments flavoniques existe à l'état de traces dans le tégument de l'Arachide. Isolée et purifiée, cette substance présente un ensemble de propriétés physiques et chimiques permettant de la classer parmi les dérivés de la flavannone. Elle n'existe pas dans le tégument sous forme d'hétéroside.

CHAPITRE V

LE CHROMOGÈNE

I. — GÉNÉRALITÉS

La notion de chromogène a vu le jour au milieu du siècle dernier. Les botanistes et les chimistes de l'époque cherchaient à élucider le mode de formation des substances colorées qui apparaissent à un certain moment de l'évolution d'un végétal. D'où proviennent ces substances aux couleurs vives et variées qui se développent à l'éclosion d'une fleur, à la maturité d'un fruit ou chez de nombreuses feuilles à la venue de l'automne ? Sont-elles créées de toutes pièces au sein du tissu où elles prennent naissance, ou bien la plante les tient-elle en réserve, sous forme de composés incolores, qu'une simple réaction physico-chimique transformerait en pigments colorés ? Certains faits semblent jouer en faveur de cette seconde hypothèse : on connaît des plantes chez lesquelles une blessure, une décortication, une piqûre d'insecte produisent une rapide coloration des tissus lésés (Mirande [125], Parkin [142], Flahaut [61], Combes [40]), explicable seulement par la transformation en pigment coloré d'un chromogène préexistant. Cette hypothèse fut définitivement adoptée lorsque des recherches d'ordre chimique eurent permis d'isoler certains de ces chromogènes, ou tout au moins de les caractériser avec précision chez de nombreux végétaux.

Le chromogène de l'Arachide se transforme aisément en cyanidol, selon Robinson [173], et cet auteur l'assimile aux leucoanthocyanes. Mais la production d'anthocyane ne peut rien laisser présumer de la structure chimique exacte d'un

chromogène. Une grande confusion règne, en effet, sur ces questions. Un certain nombre d'auteurs signalent la production de pigments colorés en rouge en traitant de façons variées des extraits végétaux incolores, mais ils ne précisent pas la nature chimique de ces pigments (Palladin [140], Keeble et Armstrong [89, 90], Noack [137], Kozlowski [94]).

De leur côté, Wheldale [211, 212] et Jonesco [82, 83] prétendent avoir transformé des chromogènes de nature flavonique en anthocyanes, au moyen de substances oxydantes. Combes, au contraire, parvient au même résultat grâce à des agents réducteurs [43, 44, 45]. Il dénie toute valeur aux travaux précédents et, s'appuyant sur les recherches de Willstaetter [214], il instaure une série d'expériences qui établissent de façon absolue la nécessité d'une réduction pour passer des flavones aux anthocyanes.

D'autres auteurs ont signalé la transformation en anthocyanes de chromogènes tanniques, soit par oxydation (Wigand [213], Gautier [68], Mirande [125]), soit par l'action des acides dilués et de la chaleur (Laborde [97], Peche [151], Tswett [204]). Tous ces travaux ont été très vivement critiqués par Combes [46, 47].

Citons enfin les travaux de Fincke [59], Bancroft [12], Knapp [92], Mackinney [118], sur les leuco-anthocyanes de diverses plantes, qui n'apportent aucune précision nouvelle sur la nature des substances étudiées. Mackinney reconnaît lui-même « qu'il est difficile de spéculer sur ce sujet avant d'avoir obtenu un produit pur et bien défini ».

C'est donc à l'obtention d'un produit pur que nous nous sommes attaché dès le début de nos recherches sur le chromogène de l'Arachide.

II. — EXTRACTION

Nous avons vu précédemment comment il est possible de mettre en évidence le chromogène de l'Arachide (voir p. 37); mais la méthode que nous avions utilisée ne permet pas un rendement intéressant; d'autre part, elle nécessite de nombreuses manipulations et le produit obtenu n'est pas exempt d'impuretés. Il s'avère heureusement possible de simplifier cette extraction grâce à l'acide chlorhydrique.

Le tégument de l'Arachide cède, en effet, à l'acide chlorhydrique dilué à la fois le chromogène et des traces de flavannone. Dans ces conditions, le tannoïde n'est pas extrait, ce qui

simplifie la purification ultérieure du chromogène. L'impureté flavonique s'élimine facilement grâce à sa solubilité dans l'éther.

A. — Technique de l'extraction

Les pellicules délipidées et broyées sont mises à macérer avec dix fois leur poids d'acide chlorhydrique à 1 p. 100. De fréquentes agitations facilitent l'extraction. Après quarante-huit heures de contact, la masse des téguments est exprimée et le liquide obtenu soigneusement filtré.

Au filtrat, dont on détermine le volume, on ajoute du chlorure de sodium en excès, environ 35 g. pour 100 cm^3. On décante la solution saturée et on l'agite à deux reprises avec le quart de son volume d'alcool amylique. Les phases amyliques sont décantées, réunies et filtrées. On les traite alors par un volume égal de benzène et le dixième de leur volume d'acide chlorhydrique à 1 p. 100. Le mélange est agité vigoureusement dans une ampoule à décantation. Après repos, on recueille la couche aqueuse inférieure qui renferme le chromogène.

La solution aqueuse est à son tour saturée de chlorure de sodium et extraite par l'alcool amylique dans les conditions fixées plus haut. On réunit les extraits amyliques et on leur ajoute du benzène en grand excès. Des flocons jaunâtres se forment et sont recueillis sur un filtre en verre d'Iéna. On les lave abondamment au benzène, qui élimine l'alcool amylique résiduel (*).

B. — Purification

Afin de priver totalement le chromogène des impuretés flavoniques, on le dissout dans l'acétone et on le précipite au sein de ce solvant par l'éther anhydre. Par dissolutions et précipitations successives, on obtient finalement un produit rigoureusement pur : l'éther de lavage ne donne plus aucune coloration jaune par agitation avec de la soude diluée.

C. — Rendement

100 g. de pellicules délipidées fournissent environ 0,50 g. de produit pur.

(*) Cette technique de préparation a fait l'objet d'un brevet.

III. — PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

Le chromogène de l'Arachide se présente sous l'aspect d'une poudre amorphe, jaunâtre, d'odeur assez vive et de saveur amère. De nombreux essais de cristallisations dans les solvants les plus variés ont toujours abouti à un échec.

Très soluble dans l'alcool et l'acétone, légèrement soluble dans l'acétate d'éthyle, le chromogène ne se dissout pas dans l'éther, le chloroforme et le benzène. L'eau pure le dissout mal, mais une faible alcalinité favorise la dissolution; on observe dans ce cas un virage du jaune pâle au rouge vineux. Si l'on revient en milieu acide, la solution se trouble. La solubilité du chromogène se modifie donc au cours de l'extraction et de la purification, puisque primitivement il se montrait soluble dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100. Robinson [173] signale ce fait et l'attribue à la perte d'un reste glucidique au cours de la purification. Le point de fusion n'a pas pu être déterminé : le produit se transforme en une masse charbonneuse vers 220°.

La solution aqueuse à 1 p. 100 ne manifeste aucun pouvoir rotatoire au tube de 5 décimètres.

IV. — TRANSFORMATION EN CYANIDOL

A. — Mode de formation

Une suspension du chromogène dans l'acide chlorhydrique à 10 p. 100 est portée à l'ébullition pendant deux minutes. Très rapidement, une coloration rose apparaît et passe progressivement au rouge cerise, puis au rouge foncé. Il ne faut pas prolonger l'ébullition au delà de deux minutes, sinon le milieu se trouble après refroidissement et laisse déposer une substance amorphe rouge brunâtre.

B. — Extraction et purification

Le colorant se laisse facilement extraire de la solution chlorhydrique par l'alcool amylique. Ce dernier, lavé à plusieurs reprises à l'eau distillée, est recueilli et filtré. A un volume de la solution amylique, on ajoute six volumes de benzène, et l'on extrait par trois volumes d'acide chlorhydrique à 1 p. 100. Le colorant passe en totalité dans l'acide dilué, d'où on l'extrait à nouveau par l'alcool amylique. Une nouvelle puri-

fication, identique à la première, permet de faire passer le colorant dans un très faible volume d'acide chlorhydrique à 0,5 p. 100. On peut arrêter la purification à ce stade, car la solution obtenue se prête fort bien à la caractérisation du cyanidol.

C. — Identification du cyanidol

Une portion de la solution précédente est agitée avec de l'alcool amylique, puis est additionnée d'acétate de sodium pulvérisé; après agitation, la phase amylique passe du rouge vif au rouge violacé. On ajoute alors I goutte d'une solution diluée de chlorure ferrique et l'on agite doucement : la coloration passe du rouge violacé au bleu vif (Robinson [172]).

Une autre portion de la solution est agitée à l'air. On y ajoute un demi-volume de lessive de soude à 10 p. 100 et, immédiatement après, de l'acide chlorhydrique concentré et de l'alcool amylique. Ce dernier se sépare coloré en rouge vif. Selon Robinson [172], ce fait caractérise la présence de cyanidol, qui se montre particulièrement stable dans ces conditions.

Coloration dans les solutions tampons. — Robertson et Robinson [170] caractérisent les anthocyanes par la coloration de leurs solutions alcalines. Ils utilisent une gamme de solutions tampons qui permet d'identifier un produit isolé en le comparant avec un produit pur. Voici les colorations observées par ces auteurs pour le chlorure de cyanidol :

*p*H 3,2	Couleur :	rouge, disparaît après dix-huit heures.
— 3,8	—	rouge bleuâtre, disparaît en quarante-cinq minutes.
— 4,4	—	violet rougeâtre, disparaît en vingt-cinq minutes.
— 5,0	—	bleu violet rougeâtre, disparaît après dix-huit heures.
— 5,6	—	violet rougeâtre. Après dix-huit heures, la base violette précipite.
— 6,2	—	rouge violacé intense et durable.
— 6,8	—	— — — —
— 7,4	—	— — — —
— 8,0	—	rouge violacé un peu plus bleu. Devient gris violet en huit minutes. Incolore après dix-huit heures.
— 8,6	—	bleu violet, bleu pur en couche mince; devient vert pâle en dix-huit heures.

*p*H 9,2 Couleur : bleu violet, moins dichroïque.
— 10,4 — — — —
Au delà de 10,4 : bleu vert instable, passant au jaune orangé.

Or, le produit de transformation du chromogène de l'Arachide se comporte absolument de la même façon. On peut donc l'identifier au cyanidol.

V. — CONSTITUTION CHIMIQUE

Nous venons de voir avec quelle facilité le chromogène de l'Arachide se transforme en cyanidol. Il existe de toute évidence des rapports étroits entre les structures chimiques de ces deux substances. Nous avons donc appliqué à l'étude du chromogène les méthodes d'analyses généralement utilisées pour préciser la constitution chimique des pigments anthocyaniques.

A. — Fusion alcaline

Après plusieurs essais au rendement défecteux, nous avons délibérément abandonné la vieille méthode de fusion potassique, consistant à projeter le produit à étudier dans une solution très concentrée d'hydroxyde de potassium maintenue aux environs de 200°. Cette méthode, beaucoup trop brutale, ne fournit aucun renseignement précis sur la constitution d'une substance aromatique : des dérivés benzéniques substitués en ortho ou en para peuvent, dans ces conditions, donner naissance à du résorcinol [168].

L'hydrolyse barytique ne présente pas ces inconvénients. Déjà préconisée par Bougault [23], elle fut appliquée par Karrer [85] à l'étude des pigments anthocyaniques. D'après cet auteur, la baryte respecte les groupements — OCH_3 et permet d'isoler les produits méthoxylés à l'état pur et cristallisé.

a) *Technique.* — Dans un matras à long col, on introduit 1 g. de substance, 2 g. d'hydroxyde de baryum et 25 cm^3 d'eau. On porte à l'ébullition pendant quinze minutes. On refroidit, on acidifie par l'acide chlorhydrique et l'on agite à plusieurs reprises avec de l'éther qui dissout les produits de l'hydrolyse. On recueille cet éther; on le lave ensuite avec une solution de carbonate acide de sodium dans laquelle passent les acides organiques, tandis que les phénols restent dans la phase éthérée.

b) *Identification des phénols.* — L'éther est lavé avec de l'acide chlorhydrique à 0,5 p. 100, décoloré au noir animal et séché sur du sulfate de sodium récemment calciné. Par évaporation, une substance amorphe se dépose. Triturée avec quelques gouttes d'eau distillée, elle cristallise rapidement.

En solution aqueuse, cette substance donne avec le chlorure ferrique une coloration violette fugace; un copeau de Sapin, imprégné de la solution, se colore en rouge vif au contact d'une goutte d'acide chlorhydrique concentré. Avec le méthylfurfural, la substance en solution aqueuse donne une coloration rouge brique et un précipité de même couleur [189]. Enfin, le point de fusion instantanée de cette substance, déterminée au bloc MAQUENNE, se montre voisin de 220°.

Ces divers essais permettent de conclure que l'éther a extrait du phloroglucinol, à l'exclusion de tout autre phénol.

c) *Identification des acides organiques.* — On acidifie la solution aqueuse bicarbonatée et on l'agite à trois reprises avec de l'éther. L'éther est lavé, décoloré et séché comme précédemment. Un résidu rougeâtre se forme par évaporation. On le redissout dans quelques cm^3 d'éther auxquels on ajoute un égal volume d'éther de pétrole. Il se produit un précipité rougeâtre dont on se débarrasse par filtration. Le filtrat, évaporé, abandonne des cristaux en aiguilles, parfois associés en gerbes ou en oursins.

Traitée par le chlorure ferrique, la solution aqueuse de ces cristaux fournit une coloration verte très intense qui vire au violet puis au rouge par addition d'une solution très diluée de carbonate de sodium. Cette réaction caractérise le radical protocatéchique [168] ; elle ne peut suffire cependant à préciser la nature exacte de la substance renfermant ce radical.

Le point de fusion, situé à 170°, se montre très inférieur aux points de fusion de l'acide protocatéchique (199°) et de ses dérivés méthoxylés. Cet abaissement pourrait-il s'expliquer par un mélange d'acide protocatéchique et d'un de ses dérivés ? Ces derniers, beaucoup moins solubles dans l'eau froide, peuvent être isolés grâce à cette propriété : si l'on dissout le résidu cristallin dans un très petit volume d'eau bouillante et que l'on filtre la solution à chaud, on voit des cristaux se déposer par refroidissement, tandis que le liquide surnageant donne toujours la réaction colorée décrite plus haut.

Après deux purifications identiques et plusieurs lavages à l'eau froide, les cristaux ainsi obtenus fondent à 211°, point

de fusion de l'acide vanillique. Des eaux-mères, on peut extraire un autre acide-phénol, fondant à 199° et présentant tous les caractères de l'acide protocatéchique.

d) *Conclusions.* — L'hydrolyse barytique du chromogène fournit un phénol : le phloroglucinol, ainsi qu'un mélange de deux acides-phénols : l'acide protocatéchique et l'acide vanillique. Ce résultat confirme la similitude de structure du chromogène avec les pigments anthocyaniques, dédoublés de façon identique par hydrolyse alcaline.

Etant donné que de très nombreuses substances aromatiques peuvent se comporter de la même manière (tannoïdes, pigments flavoniques, résines, huiles essentielles), ces réactions ne s'avèrent pas suffisantes pour nous permettre de préciser la constitution chimique exacte du chromogène.

B. — Action de l'eau oxygénée

Le peroxyde d'hydrogène agit sur les pigments anthocyaniques en scindant la molécule au niveau de l'hétérocycle. Il se forme rapidement l'acide phénolique correspondant, avec un bon rendement. Selon Karrer [85], cette méthode d'investigation donne d'excellents résultats et se montre souvent préférable à l'hydrolyse barytique, sauf lorsque le noyau phénolique latéral renferme des hydroxyles en position ortho. En ce cas, l'eau oxygénée détruit complètement la molécule, ne laissant rien subsister des dérivés du pyrocatéchol.

Le chromogène subit précisément cette destruction totale et si l'on essaie de faire passer dans l'éther les produits de dégradation résultant de l'action de l'eau oxygénée, on aboutit à un échec : aucun acide-phénol ne peut être caractérisé dans le résidu d'évaporation.

Nous avons répété cette expérience à plusieurs reprises, en suivant la technique décrite par Scott-Moncrieff [190] : le résultat fut toujours négatif.

Ce que nous savions déjà grâce à l'hydrolyse barytique se trouve donc confirmé : le cycle latéral possède des hydroxyles en position ortho qui n'ont pas résisté à l'action destructrice de l'eau oxygénée.

C. — Action du molybdate d'ammonium

Blaschko [19] a récemment décrit une réaction colorée qui permet de caractériser dans le cycle latéral des pigments antho-

cyaniques la présence de groupes phénoliques libres en position ortho. L'auteur traite les anthocyanes en solution dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100 par le molybdate d'ammonium. Il considère la réaction comme positive lorsqu'un changement de coloration se produit. La réaction demeure négative lorsque le noyau ne renferme qu'un seul hydroxyle ou encore deux hydroxyles en ortho dont l'un est méthoxylé.

Nous avons appliqué la réaction de Blaschko au chromogène de l'Arachide : la solution jaune pâle vire au jaune foncé lorsqu'on ajoute le molybdate. Le cyanidol vire dans les mêmes conditions du rouge vif au jaune foncé.

Il semble donc que le chromogène, qui possède des hydroxyles en position ortho, existe sous deux formes : la première, dans laquelle l'un des deux hydroxyles est méthoxylé, ce qui explique la production d'acide vanillique par hydrolyse barytique; la seconde, où les deux hydroxyles sont libres, ce qui permet d'expliquer la production d'acide protocatéchique et se confirme par la réaction de Blaschko positive.

De tels mélanges de dérivés méthylés et non méthylés se rencontrent fréquemment dans les produits naturels et, selon Karrer [85], cela se produirait généralement avec les plantes renfermant des pigments anthocyaniques.

E. — Hydrolyse acide

Le chromogène existe-t-il à l'état libre ou bien sous forme d'hétéroside dans le tégument de l'Arachide ? Des essais préliminaires nous avaient fait conclure en faveur de la structure hétérosidique [198]. Nous les résumerons ici brièvement.

La solution extractive dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100, convenablement filtrée et neutralisée, présente un très faible pouvoir réducteur. Après hydrolyse acide, le pouvoir réducteur augmente considérablement; cela nous avait laissé supposer que nous avions affaire à un hétéroside. Il s'agissait alors de caractériser la copule glucidique de cet hétéroside.

On sait que les oses entrant dans la constitution des anthocyanosides sont habituellement le glucose, le galactose et le rhamnose [161]. Dans une première série d'essais, nous avons préparé l'osazone de l'ose mis en évidence par hydrolyse, et nous l'avons étudiée. Nous avons alors constaté que nous nous trouvions en présence de glucosazone (point de fusion après recristallisation dans l'alcool méthylique : 224°, non abaissé par mélange avec l'osazone du glucose pur). Nous avons

examiné au microscope les cristaux de cette osazone, et l'examen a confirmé notre premier résultat : nous étions en présence de glucosazone seule, absolument exempte de galactosazone et de rhamnosazone.

Voulant préciser encore ce premier résultat, nous avons effectué une seconde série d'essais mettant en jeu certaines techniques de caractérisation des méthylpentoses [113, 120, 121]. Ces techniques consistent à distiller la solution sucrée en milieu très acide, afin de recueillir du méthylfurfural que l'on peut caractériser par diverses réactions. Nos essais se sont tous révélés négatifs. La copule glucidique de l'hétéroside était donc, nous semblait-il, constituée par du d-glucose.

Désirant savoir quel était le nombre de molécules de glucose par molécule d'hétéroside, nous avons effectué des essais quantitatifs, selon la méthode de BERTRAND, sur une solution aqueuse renfermant 0,6 g. p. 100 d'extrait sec compté comme hétéroside. Le tableau V rend compte de nos résultats.

TABLEAU V

Poids de substance	POUVOIR RÉDUCTEUR CALCULÉ EN GLUCOSE		
	Avant hydrolyse	Après hydrolyse	App. p. hydrol.
120 mg.	4,5 mg.	52,5 mg.	48 mg.

Arrivé à ce stade de nos recherches, nous avions conclu que l'hétéroside, fournissant 40 p. 100 de son poids de glucose par hydrolyse, ne pouvait être qu'un monoglucoside : en admettant pour cette substance une formule très voisine de celle du cyanidol, cette quantité de glucose cadre en effet très bien avec le chiffre de 38 p. 100 donné par la théorie.

La même solution aqueuse du chromogène, traitée par l'acétate de plomb (qui, on le sait, précipite les hétérosides anthocyaniques), donnait un filtrat non réducteur, ce qui confirmait encore la nature hétérosidique de la substance ainsi précipitée. Nous eûmes cependant l'idée de pratiquer une hydrolyse sur ce filtrat : il devint immédiatement réducteur et fournit une glucosazone très pure. Le précipité plombique, mis en suspension dans l'eau et traité par l'hydrogène sulfuré, permit de récupérer le chromogène. Il fut alors impossible de

caractériser le glucose dans la solution aqueuse de cette dernière substance.

Contrairement à ce que nous avions pensé tout d'abord, le chromogène ne possède pas la structure hétérosidique, tout au moins après son extraction. L'ose qui l'accompagne est en réalité du saccharose, comme nous l'avons vérifié ultérieurement par polarimétrie, ainsi que par la réaction de SELIWANOFF, fortement positive après hydrolyse. Le faible pouvoir réducteur qui se manifeste avant l'hydrolyse semble dû à la présence d'une petite quantité de sucre interverti : nous avons pu caractériser en effet des traces de lévulose dans la solution extractive.

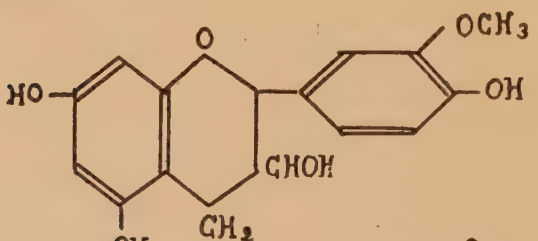
F. — ANALYSE ÉLÉMENTAIRE. — CHOIX DE LA FORMULE

Le laboratoire de microanalyse organique du C. N. R. S. a bien voulu effectuer l'analyse élémentaire de notre produit, ainsi que le dosage des groupements — OCH_3. Voici les résultats obtenus :

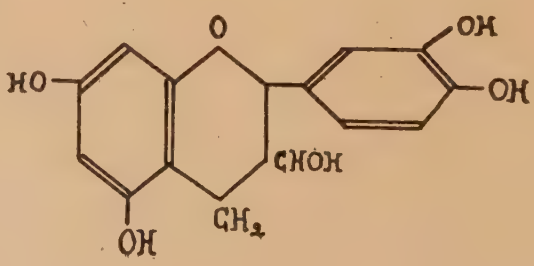
C p. 100	56
H p. 100	4,54
OCH_3 p. 100	4,43

De nouvelles analyses, faites dans le laboratoire du Professeur DUFRAISSE, au Collège de France, ont fourni des résultats identiques.

Nous basant sur les rapports étroits qui existent entre le chromogène et les substances catéchiques, nous avions, dans un précédent travail, proposé les formules suivantes pour les deux dérivés :

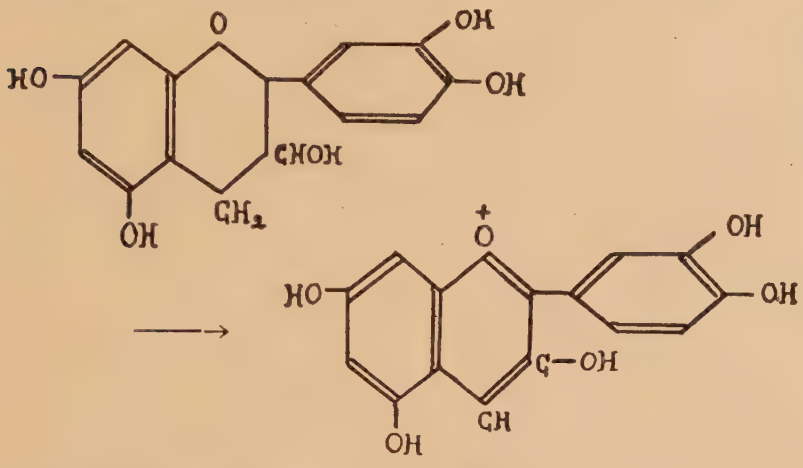


(1)



(2)

La transformation en cyanidol pouvait donc s'expliquer par une oxydation du chromogène :



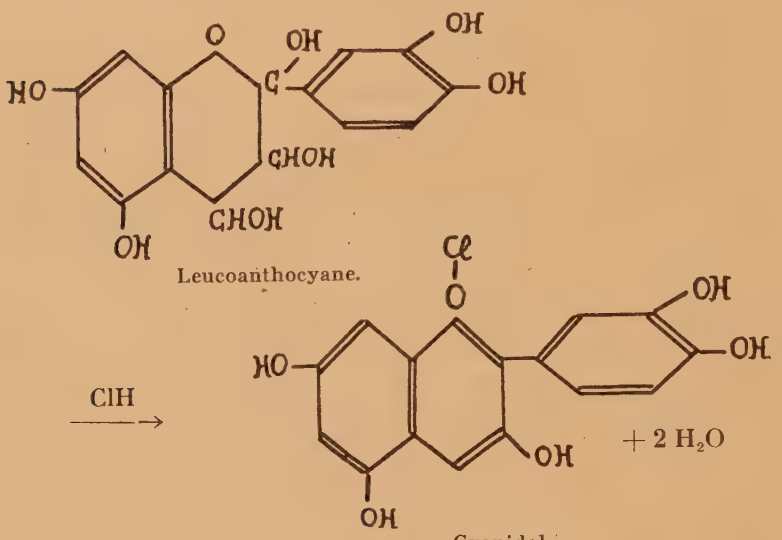
Cette hypothèse nous avait été suggérée en appliquant au chromogène la méthode d'oxydation de la catéchine en cyanidol récemment mise au point par Lavollay et Vigneau [108, 209]. Ces auteurs traitent une solution acétonique de catéchine par un volume égal d'une solution de persulfate de potassium dans l'acide sulfurique concentré. Après mélange brusque, il se produit une coloration rouge-violacée intense qui peut être recueillie dans l'alcool amylique après dilution dans l'eau froide. La solution amylique donne toutes les réactions caractéristiques du cyanidol.

Le chromogène de l'Arachide, traité dans les mêmes conditions, fournit lui aussi du cyanidol.

Désirant étudier de plus près la réaction de Lavollay et Vigneau, nous avons essayé de supprimer le persulfate de potassium dans le réactif mentionné plus haut; nous avons simplement traité la solution acétonique du chromogène par un volume égal d'acide sulfurique pur. Du cyanidol se forma tout aussi facilement. Etait-ce donc bien par une oxydation que nous pouvions expliquer cette transformation ? Ne s'agissait-il pas plutôt d'une déshydratation ? Nous penchâmes bientôt en faveur de cette dernière hypothèse lorsque des déshydratants divers (l'anhydride phosphorique en particulier) nous eurent conduit au même résultat.

Robinson rattache lui aussi la transformation des leucoanthocyanes en pigments anthocyaniques à une déshydratation du

chromogène [173]. Il propose le type de formule suivant, dans lequel le chromogène renferme le groupe — CHOH — CHOH — en position 3 - 4 dans le cycle pyranique. Par déshydratation, on obtient le cyanidol.



Les résultats analytiques cités plus haut cadrent de façon très satisfaisante avec la formule proposée par Robinson, alors qu'ils s'écartent des chiffres théoriques calculés d'après notre première formule. Le tableau VI rend compte de ces faits.

TABLEAU VI

	C	H	OCH_3
Trouvé par analyse ...	55 p. 100	4,54 p. 100	4,43 p. 100
Formule personnelle ..	63 —	5,2 —	10,2 —
Formule de Robinson..	57 —	4,75 —	9,2 —

Le taux des groupements OCH_3, inférieur de moitié aux chiffres théoriques, s'explique fort bien si l'on admet que le chromogène existe en portions égales sous la forme libre et sous la forme méthoxylée.

Nous nous rattacherons donc à l'hypothèse formulée par Robinson. Toutefois, nous voulons encore insister sur les rapports étroits qui existent entre le chromogène et les dérivés de la catéchine.

G. — Rapports du chromogène avec les catéchines

Dès nos premiers essais sur le chromogène, nous avons remarqué qu'une solution aqueuse du produit pur, abandonnée à l'air, ne tarde pas à prendre une coloration rougeâtre s'accentuant à la longue, tandis qu'un précipité de même couleur se dépose au fond du récipient. A ce moment, la fraction demeurée en solution se comporte exactement comme le tannoïde (voir page 38). Un fait analogue se produit au sein des solutions de catéchine [144], et le composé insoluble qui se forme a été analysé par Etti [54].

Nous pensons que cette transformation du chromogène résulte d'une oxydation lente au contact de l'air, car l'addition de traces de substances réductrices (sulfite acide de sodium, hydrosulfite de sodium) entrave la formation du composé coloré et du précipité.

Le chromogène peut donc réagir de deux façons bien distinctes :

1° En tant que leuco-anthocyane, il se transforme en cyanidol sous l'effet d'une déshydratation énergique.

2° En tant que composé voisin des catéchines, une oxydation lente le transforme en tannoïde.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

Nous avons extrait du tégument de l'Arachide un chromogène leucoanthocyanique déjà signalé par Robinson. Après avoir isolé cette substance à l'état pur, nous avons étudié ses propriétés physiques et chimiques; nous avons vérifié qu'elle se transformait aisément en cyanidol. Grâce à un certain nombre de tests chimiques, nous avons pu identifier, à côté du produit simple, son dérivé méthoxylé. Aucun de ces deux produits ne possède la structure hétérosidique. Des résultats analytiques nous ont conduit à proposer pour cette substance une formule en accord avec l'hypothèse de Robinson. Cette formule permet d'expliquer par une simple déshydratation la transformation du chromogène en cyanidol. Enfin, nous avons montré qu'une oxydation lente transforme cette substance en dérivé tannique, ce qui pourrait justifier la présence d'un tannoïde dans le tégument de l'Arachide.

CHAPITRE VI

LE TANNOÏDE ET LE PHLOBAPHÈNE

I. — LE TANNOÏDE

A. — Extraction. — Purification

L'extraction du tannoïde, décrite au chapitre III, ne présente aucune difficulté. Contrairement aux autres pigments de la cuticule, ce composé précipite de la solution aqueuse par addition d'un excès de chlorure de sodium.

La purification consiste à laver le précipité au moyen d'une solution saturée de chlorure de sodium. Afin de débarrasser le tannoïde du chlorure qui le souille, on le dessèche avec soin puis on le dissout dans l'acétone anhydre. En l'absence d'eau, l'acétone ne dissout pas le sel. On précipite alors le tannoïde au sein de la solution acétonique par addition d'un grand excès d'éther anhydre. Le rendement en produit pur atteint 15 p. 100 du poids des pellicules délipidées. Le tannoïde s'avère donc beaucoup plus abondant que les différents constituants étudiés jusqu'à présent.

B. — Propriétés physiques

Le tannoïde revêt l'aspect d'une poudre rouge-brunâtre, amorphe, d'odeur caractéristique et de saveur fortement astringente. Sa solution aqueuse, colorée en rouge vif, passe au rouge foncé très intense par addition d'alcali. Insoluble dans l'éther, le benzène et le chloroforme, le tannoïde se dissout aisément dans l'alcool, l'acétone et l'acétate d'éthyle. Chauffé au bloc Maquenne, il ne présente pas de point de fusion caractérisé,

mais se transforme en une masse charbonneuse au delà de 230°. Assez hygroscopique, le tannoïde doit être conservé à l'abri de l'humidité, dans des récipients soigneusement bouchés.

C. — Identification

Les travaux de Freudenberg [63, 64] sur la constitution chimique des tanins ont amené cet auteur à classer les substances tanniques en deux groupes principaux : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Le premier groupe, où figure en particulier le tanin de la noix de galle, renferme toutes les substances tanniques hydrolysables par les acides et certains enzymes. Par distillation sèche, ces substances fournissent du pyrogallol. Elles se colorent en bleu-noir avec les sels ferriques. L'eau de brome ne les précipite pas de leur solution aqueuse. L'accord ne règne pas de façon parfaite lorsqu'il s'agit de préciser la nature chimique de ces composés. Selon Fischer et Freudenberg [60], le gallotanin serait un ester pentadigallique du glucose, alors que Nierenstein [132] le considère comme un produit de condensation de plusieurs molécules d'acides gallique et digallique formant un anhydride.

Le second groupe, celui des tanins condensés ou phlobatanins, renferme des substances qui résistent à l'hydrolyse acide et enzymatique. La chaleur sèche transforme ces tanins en pyrocatéchol; les sels ferriques les colorent en vert foncé et l'eau de brome forme un précipité jaune au sein de leur solution aqueuse.

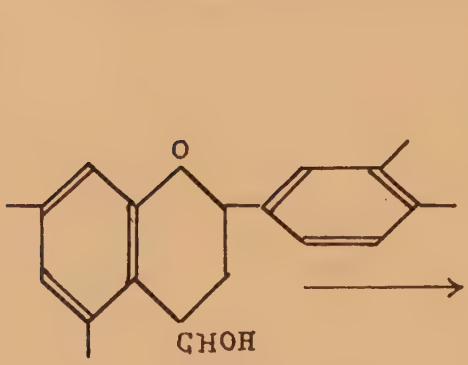
Le tannoïde de l'Arachide possède tous les caractères d'un tanin condensé : par ébullition avec un acide dilué, il se transforme en un produit rouge, insoluble, désigné sous le nom de phlobaphène; par distillation sèche, il fournit du pyrocatéchol; par fusion alcaline, il donne naissance à de l'acide protocatéchique et à du phloroglucinol. Enfin, la réaction de Stiasny [194] permet de démontrer qu'il ne renferme aucune trace de tanin pyrogallique : à 50 cm^3 d'une solution aqueuse à 4 p. 1.000 du tannoïde, on ajoute 20 cm^3 de formol à 40 p. 100 et 5 cm^3 d'acide chlorhydrique concentré. On porte à l'ébullition à reflux pendant trente minutes. Dans ces conditions, les tanins condensés précipitent quantitativement, tandis que les tanins hydrolysables restent en solution. Avec le tannoïde de l'Arachide, il se forme un précipité abondant bien avant le début de l'ébullition. Celle-ci achevée, on filtre et l'on obtient

une solution ne renfermant pas la moindre trace de tanin gallique.

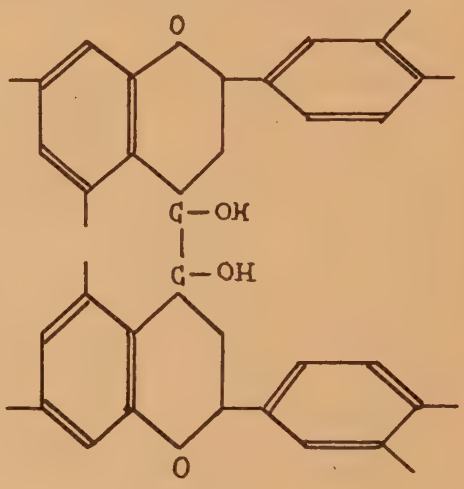
D. — Constitution chimique

Certains auteurs [65] admettent que les phlobatanins ne sont que des produits de polymérisation de la catéchine. La condensation se ferait sans élimination d'eau, par simple ouverture du cycle oxygéné.

Russel et Todd [175, 176] ont réussi à préparer par synthèse des produits en tous points comparables aux tannoïdes



4-hydroxyflavanne.

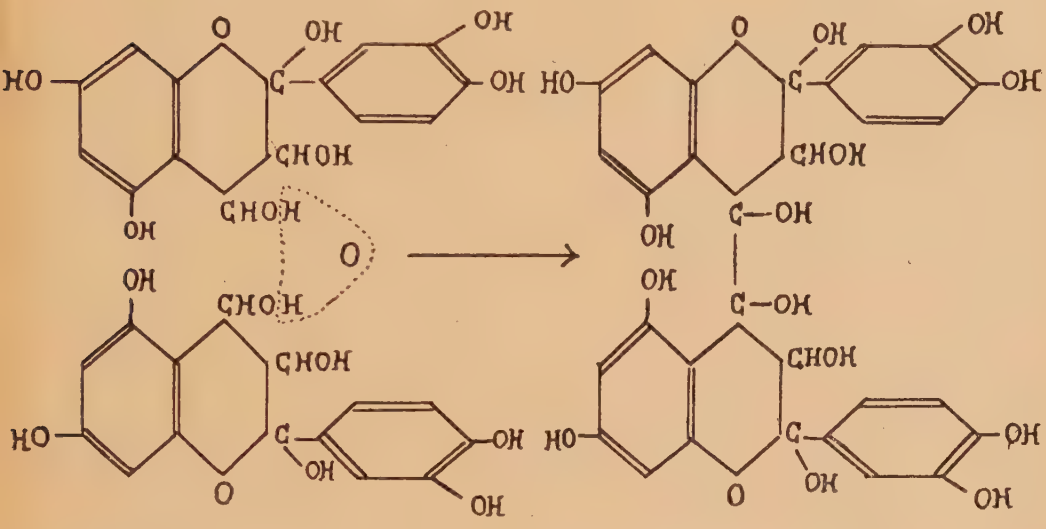


Pinacol.

catéchiques naturels. Ces substances ne dérivent pas de la catéchine (3.5.7.3' 4' pentahydroxyflavanne) mais de la 4-hydroxyflavanne ou mieux du pinacol correspondant. L'hydroxyle en position 4, absent chez la catéchine, serait essentiel à la formation du tannoïde. Les autres substitutions agissent sur la solubilité, la coloration et le pouvoir tannant du produit.

Nous avons pu démontrer que le tannoïde de l'Arachide dérive du chromogène par un dédoublement moléculaire analogue. Au chapitre précédent, nous avons signalé que le chromogène, abandonné en solution dans l'eau, ne tardait pas à se transformer en une substance présentant tous les caractères du tannoïde. Nous avons émis alors l'hypothèse d'une oxydation pour expliquer cette transformation que la présence de réducteurs réussit à entraver. Notre hypothèse trouve dans les travaux de Russel une confirmation intéressante. Par oxyda-

tion, deux molécules du chromogène pourraient s'unir au niveau des hydroxyles en position 4 et former une substance très voisine du pinacol de Russel.



Chromogène. Tannoïde.

II. — LE PHLOBAPHÈNE

Nous avons précédemment signalé (voir chapitre II, p. 20) que l'extrait alcoolique des pigments de l'Arachide présentait une coloration beaucoup plus intense si, au lieu d'utiliser l'alcool à 60°, nous mettions en jeu l'alcool à 95°.

Cette constatation s'avérait d'autant plus étonnante que l'alcool à 60° extrait une quantité de pigment plus importante que l'alcool à 95° (voir p. 18).

Nous avons cherché à élucider ce phénomène en effectuant divers essais dont nous ne retiendrons que l'un d'eux : si l'on ajoute de l'eau à la solution extractive des pigments effectuée à partir d'alcool à 95°, il se forme un précipité rouge, alors que rien de semblable ne se produit si la solution extractive contient de l'alcool à 60°. Nous avons étudié cette substance rouge soluble dans l'alcool fort et insoluble dans l'eau, et nous l'avons identifiée avec le produit obtenu par chauffage du tannoïde en milieu acide. Il s'agit donc d'un phlobaphène. Nous avons pu vérifier que ce dernier représente environ 3 p. 100 du poids du tégument.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI

Nous avons pu démontrer qu'à côté du chromogène et de la flavannone que nous venons d'étudier, le tégument de la graine d'Arachide contient un tannoïde que nous considérons comme un dérivé d'oxydation du chromogène. Le tégument contient en outre une petite quantité de phlobaphène.

CHAPITRE VII

LOCALISATION CYTOLOGIQUE DES PIGMENTS DE LA CUTICULE DE L'ARACHIDE

Dans le premier chapitre de notre étude, nous avons décrit les trois régions qui constituent la cuticule de la graine d'Arachide :

— l'assise externe;
— le parenchyme;
— l'assise interne.

Les différents pigments que nous avons isolés se trouvent-ils répartis uniformément dans ces trois régions ? Pour donner une réponse à cette question, nous avons effectué certaines réactions cytologiques d'abord sur les téguments eux-mêmes, ensuite sur des coupes transversales de ces derniers.

Le tannoïde coloré en rouge, que nous avons précédemment isolé, dérive très probablement du chromogène par simple oxydation. L'un comme l'autre peuvent être caractérisés par le réactif de Stiasny [199], qui les transforme en tannoforme insoluble; ce dernier se présente sous l'aspect d'un précipité rouge-brun, facilement décelable au microscope.

Nous avons donc projeté quelques fragments de tégument dans le réactif suivant (maintenu au bain-marie bouillant pendant vingt minutes) :

Formol à 40 p. 100	10 cm³
Acide chlorhydrique pur	5 cm³
Eau distillée q. s. ad.	100 cm³

Après lavage à grande eau, les fragments ont été montés au

baume du Canada (fig. 9 et 10). L'examen microscopique montre que les vacuoles des cellules appartenant à l'assise externe présentent une coloration rouge-brunâtre, due à la présence d'un précipité; c'est donc dans ces cellules que se trouvent situés le chromogène et le tannoïde.

Afin de corroborer ce premier résultat, nous avons effectué la coloration des substances précipitées à l'aide des sels de chrome. Pour cela, nous avons laissé séjourner le tégument pendant quarante-huit heures dans une solution de bichromate de potassium à 3 p. 100. Après lavage sous eau courante (pendant deux heures), nous avons effectué le montage au baume du Canada.

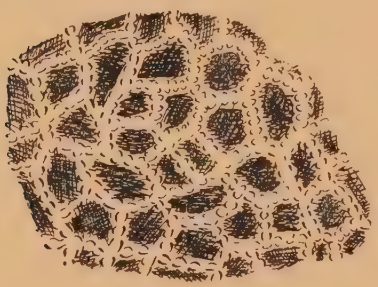


Fig. 9.

Tégument de la graine d'Arachide (après traitement par le réactif de Stiasny).

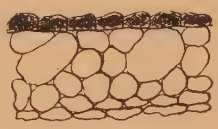


Fig. 10.

Coupe du tégument de la graine d'Arachide (après traitement par le réactif de Stiasny).

L'examen microscopique montre que les vacuoles des cellules de l'assise externe se trouvent colorées en jaune brunâtre (précipitation d'un chromate insoluble), ce qui confirme notre premier résultat.

Cette seconde technique se montre plus délicate que la première : la coloration aux sels de chrome présente l'inconvénient de durcir le tégument et rend le montage plus délicat.

Ces deux séries d'essais permettent de conclure que le chromogène et le tannoïde de la cuticule de l'Arachide se trouvent localisés dans les vacuoles de l'assise externe.

La flavannone, que nous avons isolée en très petite quantité, allait-elle se trouver également dans l'assise externe ? Cette substance peut être facilement mise en évidence grâce à la coloration jaune intense qu'elle prend sous l'influence des vapeurs d'ammoniac.

Nous avons donc soumis des coupes du tégument de l'Ara-

chide à l'influence de vapeurs ammoniacales, après avoir pris soin de les imbiber d'eau. Nous les avons ensuite examinées au microscope. Nous avons alors constaté que seules les cellules de l'assise interne se coloraient en jaune, ce qui permet de conclure que la flavannone se trouve localisée dans les vacuoles de l'assise interne.

***

Nous nous sommes enfin demandé si la cuticule constituait le seul organe de la graine renfermant les substances précédemment décrites.

Quelques recherches nous ont montré que le chromogène se rencontrait également dans l'amande de la graine. Si, en effet, on traite la poudre de l'amande, après l'avoir soigneusement privée des moindres traces de pellicules, par une solution d'acide sulfurique à 5 p. 100, on obtient, après deux heures d'ébullition, un liquide qui présente une faible coloration rose.

Bien plus, les protéides de l'amande d'Arachide [197], purifiés par précipitations et redissolutions successives, puis traités à l'ébullition pendant une heure en présence d'acide sulfurique à 5 p. 100, confèrent à la solution une coloration rose. Celle-ci vire au vert par alcalinisation du milieu. Toutes ces réactions s'avèrent bien caractéristiques du chromogène qui, traité à l'ébullition en milieu acide, s'est transformé en cyanidol.

Des traces du chromogène se trouvent donc adsorbées sur les protéides de l'amande de l'Arachide. Cette constatation n'est pas surprenante, lorsque l'on sait la notable affinité que présente le chromogène vis-à-vis des protéides de l'Arachide (Tayeau et Masquelier [199]).

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VII

Le chromogène et le tannoïde que nous sommes parvenu à isoler du tégument de la graine d'Arachide se trouvent localisés dans les cellules constituant l'épiderme externe de ce tégument. Ces deux substances étant solubles dans l'alcool, nous avons dû les insolubiliser, soit à l'état de tannoformes, soit à l'état de chromates, avant de monter les préparations microscopiques au baume du Canada.

La flavannone se rencontre, au contraire, dans les cellules de l'assise interne.

On peut trouver également des traces de chromogène, adsorbé sur les protéides, dans l'amande de l'Arachide.

DEUXIÈME PARTIE

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES PIGMENTS DE LA GRAINE D'ARACHIDE

CHAPITRE PREMIER

TOXICITÉ

Lorsqu'à la suite de nos essais précédemment décrits, nous avons pu proposer des formules chimiques pour les composés que nous avons étudiés, nous n'avons pas manqué d'établir un rapprochement entre la constitution de ces derniers et celle de certaines substances possédant une activité pharmacodynamique intéressante. Aussi, dès ce moment, nos préoccupations se sont-elles orientées vers l'étude biologique de nos produits.

Avant toute chose, nous avons désiré savoir si les constituants de la cuticule de l'Arachide présentaient une certaine toxicité. Pour cela, nous avons utilisé le Cobaye comme animal d'expérience et, suivant la méthode préconisée dans le chapitre II, nous avons préparé un extrait aqueux brut des pigments de l'Arachide : cet extrait contient donc le chromogène, le tannoïde et la flavannone.

Les six Cobayes que nous avons utilisés dans cette expérience présentaient les caractéristiques mentionnées dans le tableau VII.

Au premier Cobaye (n° 1), nous avons injecté, dans le péritoine, 7,5 cm^3 de la solution, correspondant à 375 mg. d'extrait sec, soit 600 mg. par kg. d'animal. Le second Cobaye (n° 2) a reçu 177 mg. d'extrait, soit 300 mg. par kg. Aux deux suivants (n^{os} 3 et 4), 36 et 27 mg. d'extrait ont été administrés, soit 60 mg. par kg. Les derniers, enfin (n^{os} 5 et 6), ont servi de témoins.

Les Cobayes 1 et 2 sont morts après quarante-huit heures, les deux suivants (3 et 4) après dix jours. Cette première observation nous permet donc de conclure que l'extrait total

des pigments hydrosolubles de l'Arachide présente une certaine toxicité.

Cherchant à étudier le phénomène de plus près, nous avons pesé les animaux au moment de leur mort et nous avons noté une perte de poids très appréciable, ainsi que le montrent les chiffres consignés dans le tableau VII.

Nous avons sacrifié ensuite les deux Cobayes témoins et nous avons autopsié les six animaux. Nous avons prélevé les organes qui, chez les animaux intoxiqués, nous paraissaient modifiés (foie, reins et glandes surrénales), et nous les avons pesés. Cela nous a permis d'établir les rapports :

$$\frac{\text{poids du foie}}{\text{poids de l'animal à la mort}} \text{ et } \frac{\text{poids des surrénales}}{\text{poids des reins}}$$

Les résultats que nous avons obtenus, et qui se trouvent également rassemblés dans le tableau VII, montrent que les animaux intoxiqués avaient subi non seulement une atrophie du foie, mais encore une hypertrophie des surrénales.

Des coupes histologiques pratiquées sur ces organes permettent, en outre, de faire les constatations suivantes :

Le foie ne présente pas de lésion très nette. Cependant, les cellules, franchement éosinophiles, semblent plus petites que normalement, mais ne montrent aucun signe de dégénérescence, ni cytoplasmique, ni nucléaire. Les capillaires sont pour la plupart fermés, mais les veines centrolobulaires et celles des espaces portobiliaires apparaissent béantes et remplies d'hématies.

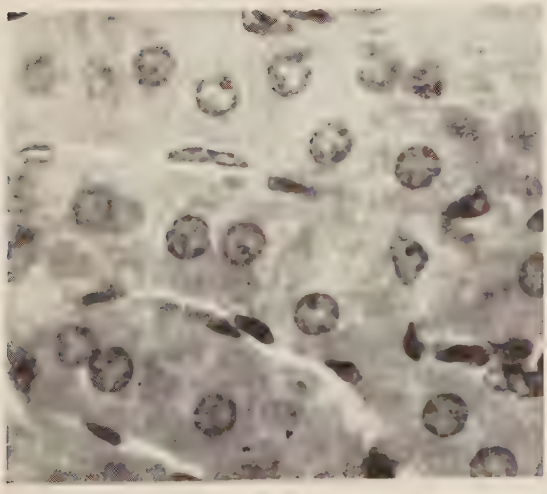
Les glandes surrénales présentent d'importantes modifications : elles se montrent très hypertrophiées, surtout dans la région corticale : la zone fasciculée, très épaisse, est formée de cellules de grande taille dont le protoplasme apparaît éosinophile et homogène; le noyau semble riche en chromatine; les spongiocytes y sont rares; les capillaires sont collabés. L'ensemble de la zone corticale s'avère très dense. En revanche, les vaisseaux de la médullosurrénale sont excessivement dilatés; ils occupent la majeure partie de la médulla et dilacèrent son parenchyme. De petites hémorragies séparent de place en place des îlots de cellules phæochromes qui ne présentent par ailleurs rien de particulier.

Ces symptômes généraux d'intoxication se montrent différents de ceux que l'on observe au cours de l'intoxication par les tanins galliques. Dans ce dernier cas, on observe surtout

FOIE

Cobaye traité par l'extrait total.

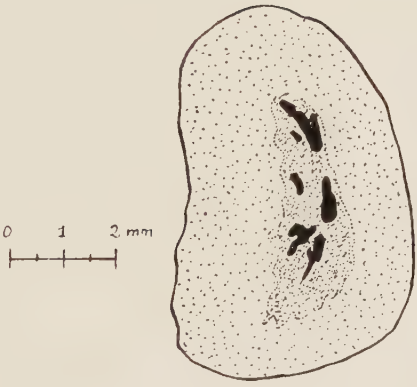
G. 110



G. 900

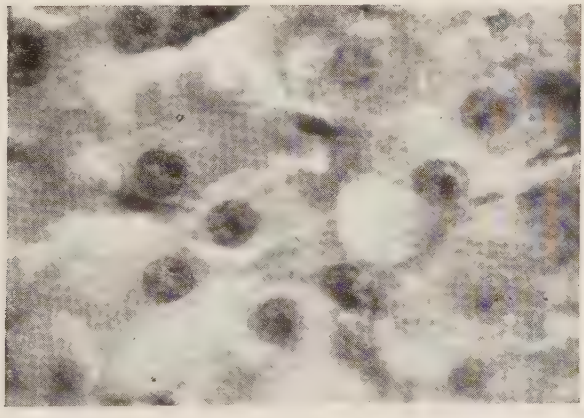
Cobaye traité par l'extrait total.

Hypertrophie générale intéressant surtout le cortex. Dilatation vasculaire intense de la médullaire.



Cobaye traité par l'extrait stabilisé.

Image normale.



Hypertrophie de la corticosurrénale.
G. = 900 ×

TABLEAU VII

Nos	Poids (g.)	Dose d'extrait sec injectée chaque jour		Mort après	Dose totale (mg.)	Poids de l'animal en fin d'expérience (g.)	Perte de poids (p. 100)	Poids des organes après la mort (g.)			RAPPORTS	
		en mg.	en mg. par kg. d'animal					foie	2 surrénales	2 reins	Poids du foie / Poids de l'animal	Poids surrénales / Poids reins
1	625	375	600	48 h.	750	505	19,2	25,2	1,40	5,50	1/20	1/4
2	590	177	300	48 h.	354	525	11	22,8	0,84	4,95	1/23	1/6
3	600	36	60	10 j.	360	375	37,5	18,7	1,0	5,0	1/20	1/5
4	450	27	60	10 j.	270	293	35	13,3	0,88	4,40	1/22	1/5
5	410	»	»	»	»	410	0	34,1	0,70	5,48	1/12	1/8
6	626	»	»	»	»	595	4,8	49,5	0,71	5.60	1/12	1/8

une nécrose hépatique [14, 29, 53, 114, 210, 219], ce que nous n'avons jamais observé avec notre extrait.

L'extrait aqueux injecté contenait, nous l'avons vu, des substances variées; il paraissait donc plausible de penser que ces diverses substances ne présentaient pas toutes la même toxicité et que les symptômes observés pouvaient être dus à l'un seulement des composants de l'extrait. Hormis la flavannone, ces derniers présentent une stabilité très relative et s'oxydent très rapidement. Si, en effet, on prépare une solution fraîche du chromogène, on constate qu'après peu de temps, la solution se colore en rouge; le chromogène se transforme en tannoïde, puis il ne tarde pas à apparaître un précipité brun-rouge de phlobaphène.

Nous avons pensé qu'*in vivo*, la formation de ces dérivés d'oxydation n'était pas impossible et qu'il fallait peut-être rattacher à ces derniers la toxicité du produit. Nous avons alors cherché un moyen d'empêcher l'oxydation. Après plusieurs essais que nous ne rapportons pas ici, nous avons adopté le bisulfite de sodium déjà utilisé en pharmacie pour protéger de l'oxydation le soluté injectable d'adrénaline du Codex. Lorsqu'on ajoute du bisulfite de sodium (0,25 p. 100) à une solution aqueuse du chromogène, on évite son oxydation et la solution se conserve longtemps. Si le bisulfite est ajouté à l'extrait aqueux des pigments de la cuticule, le phlobaphène ne se forme pas.

Il nous a paru intéressant, étant donnée l'hypothèse que nous venons d'émettre, de voir si l'injection de l'extrait présentait la même toxicité en présence qu'en l'absence de bisulfite de sodium.

Nous avons donc effectué une nouvelle série de recherches, comparable en tous points à celle précédemment décrite, mais cette fois nous avons injecté l'extrait stabilisé par le bisulfite de sodium. N'ayant pas du tout constaté de symptômes toxiques, nous avons mis en œuvre une troisième série d'essais portant sur dix Cobayes dont les caractéristiques se trouvent mentionnées dans le tableau VIII. Les huit premiers Cobayes de cette série ont reçu chacun 50 mg. d'extrait stabilisé par kg. d'animal pendant dix jours. Après cette période, nos animaux avaient reçu des doses d'extrait de l'ordre de 400 mg., et ils ne présentaient pas de symptômes toxiques. Bien plus, ils avaient grandi normalement, à part une exception, ainsi que le montrent les chiffres consignés dans le tableau VIII.

Un mois après le début de l'expérience, tous les animaux

TABLEAU VIII

N°s	Poids (g.)	Dose journ^re injectée, en mg. par kg. d'animal	Dose reçue après 10 j. (mg.)	Poids après 10 j. (g.)	Poids après 20 j. (g.)	Poids après 30 j. (g.)	Gain de poids après 10 j. de traitement (g.)
1	1.100	50	550	1.122	1.130	1.136	22
2	1.000	50	500	1.012	1.041	1.057	12
3	940	50	470	948	960	1.100	8
4	780	50	390	770	793	812	— 10
5	780	50	390	833	849	885	53
6	790	50	395	855	910	932	65
7	740	50	370	815	860	895	75
8	700	50	350	760	790	835	60
9	730	0	0	810	860	907	80
10	700	0	0	772	829	882	72

injectés se comportaient absolument comme les Cobayes témoins.

Dans une dernière série d'essais, nous avons administré pendant plusieurs jours, à quelques Cobayes, l'extrait stabilisé et nous avons sacrifié ces animaux afin d'étudier les coupes de leur foie et de leurs glandes surrénales. Ces coupes se sont montrées identiques à celles pratiquées sur les animaux témoins.

Cette nouvelle série d'essais montre donc que la toxicité de l'extrait que nous avons utilisé se trouve liée à la facilité avec laquelle s'oxydent ses constituants.

Les Cobayes précédemment étudiés avaient été soumis à diverses épreuves que nous ne décrirons pas, sauf toutefois l'une d'entre elles, qui n'a pas manqué d'attirer notre attention : le temps de saignement.

Nous avons effectué une expérience portant sur huit Cobayes; les six premiers recevaient journellement, et pendant cinq jours, 1 mg. d'extrait stabilisé; les deux autres servaient de témoins. Nous avons mesuré (en secondes) le temps de saignement au début de l'expérience, puis après des temps variés. Nos résultats se trouvent consignés dans le tableau IX.

Ils montrent que les Cobayes traités par l'extrait stabilisé (n°s 1 à 6) présentent un temps de saignement nettement diminué par rapport aux Cobayes témoins (n°s 7 et 8).

TABLEAU IX

N°s	Poids (g.)	Sexe	Temps de saignement initial (secondes)	Après 24 h.	Après 15 j.	Après 30 j.
1	640	M	120	60	60	90
2	570	M	120	45	60	90
3	540	M	105	60	60	105
4	737	F	90	45	75	90
5	628	F	105	60	60	90
6	580	F	105	60	60	120
7	718	M. témoin	120	120	120	105
8	655	F. témoin	105	105	120	105

L'extrait injecté paraissait donc posséder des propriétés physiologiques comparables à la vitamine K ou bien aux diverses substances habituellement décrites sous le nom de « vitamines P ». Cette seconde éventualité nous a paru plus vraisemblable étant donnée la parenté de structure qui existe entre le chromogène que nous avons isolé et les « vitamines P ». Ces dernières possèdent, en outre, la propriété d'augmenter la résistance capillaire.

Nous avons donc décidé de porter notre attention sur les propriétés biologiques de chacun des constituants de la cuti-

cule. L'étude que nous avons effectuée fait l'objet des chapitres suivants.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

L'extrait aqueux de la cuticule d'Arachide présente pour le Cobaye une certaine toxicité. Celle-ci paraît due à la formation de dérivés d'oxydation, car si l'on injecte l'extrait en présence d'un réducteur, en l'occurence le bisulfite de sodium, les symptômes toxiques n'apparaissent pas.

CHAPITRE II

ÉTUDE BIOLOGIQUE DU CHROMOGÈNE

Le chromogène que nous sommes parvenu à isoler de la cuticule de la graine d'Arachide présente une certaine parenté de structure avec l'aglycone de l'hespéridoside, substance extraite du citron et désignée la première par SZENT-GYÖRGYI sous le nom de vitamine P [4].

LA VITAMINE P

C'est en 1828 que LEBRETON [109], le premier, isola l'hespéridoside de l'écorce d'orange, mais, à cette époque, l'auteur ne soupçonna pas l'importance biologique de sa découverte. C'est seulement cent huit ans plus tard que l'intérêt de cette substance gagna l'actualité : en 1936, en effet, SZENT-GYÖRGYI et ses collaborateurs [4, 15, 177] mettaient en évidence le pouvoir que possèdent les extraits de citron et de paprika d'augmenter la résistance capillaire chez l'Homme. Ils montraient peu après que cette propriété se trouvait liée à la présence d'hespéridoside dans l'extrait [3]. SZENT-GYÖRGYI attribuait ensuite cette activité à une substance très voisine, dérivée de la flavannone, l'ériodictyoside [24], puis plus tard au quercétol [195].

D'après RUSZNIAK et SZENT-GYÖRGYI [177], les phénomènes hémorragiques du scorbut ne seraient pas dus à la carence en vitamine C, mais à la carence en vitamine P. Certains auteurs, ayant probablement soupçonné la différence d'action entre les deux substances, avaient déjà proposé, quelques années auparavant, le dédoublement de la vitamine C en deux facteurs (RYGH [179], BEZSSONOFF [16]) ; d'autres, grâce à quelques observations cliniques, avaient noté que certains accidents hémorragiques, ne paraissant pas appartenir au tableau clinique du scorbut, avaient régressé après administration de jus de citron et de tomate (BRISKAS, NOBÉCOURT, DELBARRE, etc. [28, 138]).

L'existence de cette nouvelle vitamine, différente de l'acide ascorbique, suggéra de multiples controverses (Zilva [224], Moll [127], Bensath et Szent-Györgyi [15], Von Euler et Malmberg [55], Armentano [4], Menkin [123], Mouriquand [128], Parrot, Galmiche et Cotereau [145, 150], Zacho [221]).

Un certain nombre de revues générales très documentées ayant paru sur cette question [24, 80, 101, 102, 148, 183], nous nous contenterons de la résumer brièvement en ne retenant que l'essentiel.

Plusieurs composés chimiques, tous de structure flavonique, peuvent être rattachés au groupe des vitamines P [78, 103, 182], mais, selon Lavollay, Parrot et Sevestre [105], l'épicatéchine constituerait la substance la plus active.

Les vitamines P auraient été rencontrées dans le citron, le paprika, l'orange, la tomate [177], la rose [8], le raisin, les prunes, les pommes de terre [185], les lentilles, les épinards, les pois [39], le cassis [157], le sarrazin [200] et le vin [107].

On a même pu isoler de certains tissus animaux des substances ayant également une activité sur la résistance capillaire [169].

Bien des recherches ont été effectuées en ce qui concerne le mode d'action de ces substances. Dès 1940, Lavollay [104] a émis une hypothèse suivant laquelle la vitamine P inhiberait l'oxydation de l'adrénaline, dont l'une des fonctions serait précisément de régler le tonus des vaisseaux capillaires; en l'absence de vitamine P, l'adrénaline serait rapidement oxydée dans l'organisme et la résistance capillaire se trouverait considérablement diminuée. Cette hypothèse trouve sa raison d'être dans la propriété que possèdent les vitamines P d'inhiber l'autoxydation de l'adrénaline; ces vitamines inhibent, en outre, l'autoxydation de l'acide ascorbique (*).

Pour déterminer l'activité de ces substances, on peut mesurer la résistance capillaire. Cette méthode, utilisée pour la première fois par Hecht [75] en 1907, a fait l'objet d'études détaillées de Borbely [21] et de Franke [62] (**).

Elle est basée sur le fait qu'à l'état normal la paroi des petits vaisseaux présente une forte résistance mécanique; dans l'hyporésistance capillaire, cette paroi peut devenir très fragile; dans ce cas, une légère distension produit des effractions avec épanchements sanguins punctiformes périvasculaires habituellement désignées sous le nom de *pétéchies*.

Ces dernières apparaissent facilement chez l'individu carencé, soit par compression (techniques originales de Hess [77] et Göth-

---

(*) L'adrénaline ne constituerait pas la seule hormone susceptible d'agir sur le maintien de la résistance capillaire, les hormones hypophysaires [95], corticosurrénales [34, 50], thyroïdienne [76], splénique [207] joueraient également un rôle appréciable.

(**) On trouvera des détails sur les méthodes de mesure dans quelques revues générales [17, 67, 143].

LIN [71]), soit par succion (technique de HECHT [75]). Deux grandes séries de méthodes basées sur ces deux procédés ont été mises en jeu. Les premières restent assez peu utilisées, les secondes, au contraire, ont fait l'objet de multiples recherches.

Les techniques basées sur la compression utilisent généralement un manchon pneumatique que l'on applique sur le bras et que l'on gonfle jusqu'à l'obtention de la suppression du pouls; la pression reste maintenue un temps donné, après lequel on compte le nombre de pétéchies apparues; au delà d'un certain nombre, le test est considéré comme positif (HESS [77]). Les autres méthodes basées sur la pression constituent pour la plupart des variantes de la méthode de HESS [48, 148, 174].

Les techniques utilisant la dépression mettent en jeu une petite ventouse que l'on applique sur la peau et dans laquelle on fait un vide que l'on mesure grâce à un manomètre. On peut alors déterminer deux facteurs : la grandeur et la durée de la dépression nécessaire pour l'apparition des premières pétéchies. On comprend aisément qu'il faudra exercer une dépression d'autant plus élevée que la durée sera plus courte.

Pratiquement, on mesure la résistance des capillaires par la plus petite dépression nécessaire à obtenir la rupture lorsque l'action a été maintenue pendant une minute (PARROT et GALMICHE [148]).

De très nombreux appareils ont fait l'objet de descriptions pour la mesure de la résistance capillaire par dépression [9, 10, 25, 30, 49, 180, 191, 201, 222]; tous restent basés sur le même principe.

Cette méthode de mesure a suscité de très nombreuses et véhémentes critiques, certains auteurs estimant que les résultats obtenus par les divers opérateurs ne présentaient entre eux aucune concordance [218]. Notre expérience dans ce domaine nous a montré que si l'on respecte certaines règles essentielles (opération effectuée par le même opérateur, jamais sur des plans osseux et toujours au même endroit [7]), on obtenait des résultats très fidèles.

En raison sans doute des critiques apportées aux méthodes précédentes, AMBROSE et DE EDS [2] ont proposé une méthode applicable au Lapin et qui consiste à injecter dans la veine marginale de l'oreille une solution de bleu de trypan. Après un certain temps, on applique sur le ventre de l'animal un tampon imbibé de chloroforme; on calcule ensuite le temps mis par le colorant à apparaître dans la zone irritée. Ce temps s'avère très restreint dans les états carencés. Il importe de noter que cette dernière technique mesure plutôt la perméabilité capillaire que la résistance capillaire (*).

(*) Signalons encore la méthode préconisée par MAJOVSKI [119] et qui consiste à faire un vide rapide dans un récipient contenant des Souris. Des hémorragies pulmonaires apparaissent, mais peuvent être évitées si les animaux ont été préalablement traités par des préparations vitaminiques P. Cette méthode a été vivement critiquée par KIBRICK et GOLDFARB [91].

Toutes ces méthodes, lorsqu'elles sont appliquées avec soin, constituent des tests très convenables pour la mesure de la résistance capillaire.

En dehors de son action sur la résistance capillaire, la vitamine P possède également la propriété d'abaisser le temps de coagulation (Vacek [208]) et de raccourcir le temps de saignement (Ungar [206], Parrot et Galmiche [149]). Elle posséderait encore des propriétés hémostatiques [166], hypotensives [110] et peut-être même cryptotoxiques [112].

La vitamine P a été utilisée en thérapeutique et avec succès dans les cas de fragilité capillaire [67, 165, 182, 186, 187], dans le purpura vasculaire [111, 51], dans diverses cirrhoses [18, 38, 98, 122, 141], dans les néphrites hémorragiques [99, 100], dans les hémorragies digestives [167, 220], dans les exsudations séreuses [195], dans le goitre exophtalmique [76], etc.

La vitamine P ne présente pas une très grande spécificité : l'acide ascorbique s'avère capable, dans certains cas, lui aussi, de faire régresser les troubles de la résistance capillaire; de plus, bien des substances trouvées dans les aliments se montrent susceptibles d'empêcher l'autoxydation de l'adrénaline [106, 159].

Cela laisse penser que les propriétés attribuées aux diverses préparations correspondent à une action purement pharmacodynamique. Dans ces conditions, le terme *vitamine* serait déplacé (Javillier [81]). Beaucoup de chercheurs se sont rangés à cette opinion et considèrent simplement les dérivés de structure flavonique, habituellement groupés sous le nom de vitamine P, comme des substances douées d'une activité pharmacodynamique commune. Quoi qu'il en soit, il s'agit de substances jouant un rôle incontestable sur la résistance capillaire.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PHARMACODYNAMIQUE DU CHROMOGÈNE

Il nous a donc paru intéressant de savoir si le chromogène que nous avions isolé de la cuticule de l'Arachide, et dont la constitution chimique se montre très voisine des substances du type vitamine P, présentait lui aussi une action sur la résistance capillaire.

Nous avons choisi le Cobaye comme animal d'expérience. Si l'on veut obtenir des résultats fidèles, il s'avère indispensable de choisir des animaux présentant un ventre blanc, afin que l'apparition des pétéchies puisse être facilement saisie. La région expérimentée doit être soigneusement rasée, puis enduite de vaseline afin d'assumer l'étanchéite parfaite entre la peau de l'animal et la ventouse de l'appareil de mesure.

Ce dernier, que nous avons construit nous-même, comporte une petite ventouse d'un diamètre de 10 mm., reliée par un tube de caoutchouc à une trompe à vide. Sur le trajet du tube se trouvent interposés un grand récipient, destiné à amortir les brusques écarts de pression, et un manomètre à mercure. Le récipient possède un dispositif d'admission d'air permettant de régler la dépression sans agir sur la trompe à vide. La figure ci-dessous représente notre appareil.

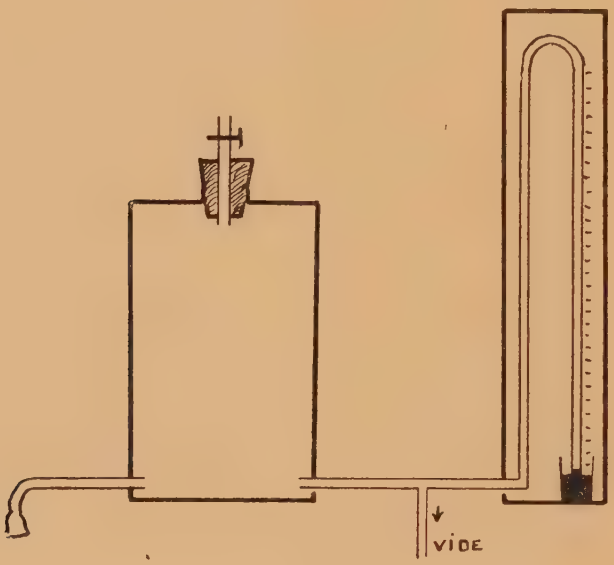


Fig. 11.

Technique de la mesure

1° *Réglage de l'appareil.* — Avant d'appliquer la ventouse sur le Cobaye, il faut régler l'appareil de façon à exercer une dépression connue en un temps donné. Pour cela, on met en marche la trompe à vide en laissant ouvert le dispositif d'admission d'air. On obture alors la ventouse et l'on règle l'admission d'air de manière à obtenir la dépression désirée en trente secondes. Cette dépression doit se maintenir constante indéfiniment lorsque le réglage est parfait.

2° *Mesure.* — La ventouse est appliquée sur la région abdominale du Cobaye, en ayant soin d'éviter la présence d'un plan osseux sous-jacent. Trois éventualités peuvent se produire :

Des pétéchies apparaissent pendant l'ascension de la colonne de mercure : la dépression choisie est trop forte, il faut régler l'appareil à une dépression plus faible.

Des pétéchies se forment au cours des trente secondes qui suivent la stabilisation du manomètre : ce dernier indique alors directement la valeur de la résistance capillaire.

Aucune pétéchie ne se produit pendant les trente secondes qui suivent la stabilisation de la dépression : cette dernière s'avère trop faible; il faut régler l'appareil à une dépression plus forte.

3° *Remarques.* — On ne tient pas compte des pétéchies apparaissant à la périphérie de la région déprimée; seules seront notées les deux ou trois premières pétéchies qui se produisent au centre de cette région.

Lorsque la mesure de la résistance capillaire n'a pu se faire au premier essai, on recommence l'opération dans une région aussi voisine que possible, après avoir laissé le Cobaye au repos pendant quinze à vingt minutes.

Le Cobaye réagit au froid par une augmentation de sa résistance capillaire [9]. Il faut donc opérer sur des animaux ayant séjourné au moins deux heures à la température du laboratoire.

Certains auteurs [221] préfèrent utiliser un dépilatoire pour mettre à nu l'épiderme du Cobaye; on obtient d'aussi bons résultats en rasant avec précaution la région intéressée; de toute façon, ces opérations doivent être suivies d'un repos assez prolongé (une nuit paraît suffisante), car l'irritation locale qu'elles engendrent pourrait modifier la résistance capillaire de l'animal.

Un certain nombre d'essais effectués sur des Cobayes normaux nous a montré qu'avec notre méthode la résistance capillaire de ces animaux oscille entre 10 et 14 cm. de mercure (*).

Nos expériences ont porté sur quatorze Cobayes recevant chacun, par voie intrapéritonéale, une dose de chromogène

(*) Nous avons renoncé à soumettre préalablement nos animaux à des régimes dits carencés [146, 147], ces derniers ne faisant pas baisser sensiblement le taux normal. Nous avons rencontré, au cours de nos essais, un certain nombre de Cobayes présentant une résistance capillaire anormalement élevée. Ces animaux ont été réunis et utilisés pour l'étude biologique du tannoïde (voir chapitre IV de la deuxième partie).

comprise entre 0,1 et 4 mg. Deux des Cobayes mis en jeu ont servi de témoins. Après avoir mesuré la résistance capillaire des animaux au moment de l'injection, nous avons fait une série de mesures successives qui nous ont permis d'étudier les variations de la résistance capillaire en fonction du temps. Les résultats que nous avons obtenus se trouvent mentionnés dans le tableau X.

TABLEAU X

N°s	Dose injectée (mg.)	R. C. initiale (cm. de Hg)	RÉSISTANCE CAPILLAIRE APRÈS :						
			2 h.	6 h.	24 h.	36 h.	48 h.	96 h.	120 h.
1	4 »	10	14	15	19	24	18	12	12
2	2 »	11	13	15	16	18	20	14	14
3	2 »	10	12	12,5	15	17	21	17	13
4	2 »	13	15	16	18	27	29	18	16
5	1 »	13	14	15	21	30	28	20	17
6	1 »	11	14,5	16	20	30	25	25	25
7	1 »	13	14	15	18	30	24	23	20
8	0,50	12	13	13,5	15	17	24	24	23
9	0,50	10	13,5	15	18	23	24	30	24
10	0,25	14	14,5	15	17	30	30	24	20
11	0,25	11	11	13	15	21	25	20	14
12	0,10	12	12	12,5	14	15	17	16	14
13	témoin	11	10	13	11	11	12	13	12
14	témoin	13	14	10	11	13	10	13	12

La figure 12 correspond aux résultats du tableau, une moyenne ayant été établie pour tous les Cobayes traités par le chromogène, ainsi que pour les deux Cobayes témoins.

L'examen du tableau et des courbes montre que le chromogène possède une action très nette sur la résistance capillaire

du Cobaye. La substance agit à très faible dose et cette action se trouve longtemps maintenue, puisqu'après cent vingt heures le taux de résistance capillaire initiale n'a pas encore été atteint. Les courbes présentent un maximum trente-six à quarante-huit heures après l'injection; il semble qu'après ce laps de temps, la substance s'élimine peu à peu, la résistance capillaire tendant à diminuer.

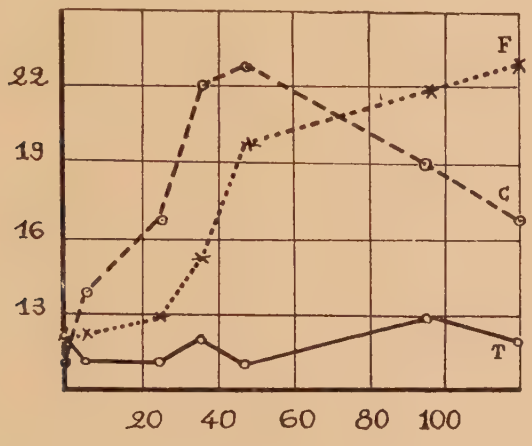


Fig. 12.

Courbes représentatives des variations de la résistance capillaire en fonction du temps.

En abscisse : temps, en heures.
En ordonnée : résistance capillaire, en cm. Hg.
F : Cobayes traités par la flavannone.
C : Cobayes traités par le chromogène.
T : Cobayes témoins.

Une nouvelle série d'essais effectuée également sur des Cobayes nous a montré que le chromogène ne présentait aucune toxicité. Les animaux traités n'ont pas perdu de poids et des coupes pratiquées sur leur foie et sur leurs glandes surrénales n'ont présenté de lésions d'aucun ordre.

Signalons encore que l'un de nos Cobayes a reçu une dose de 20 mg. de chromogène. Sa résistance capillaire est devenue très élevée et nous ne sommes pas parvenu à la mesurer avec notre appareil (supérieure à 40 cm.). Malgré cela, l'animal n'a présenté aucun symptôme toxique.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Le chromogène leucoanthocyanique que nous avons isolé de la cuticule de l'Arachide présente une action très nette sur la résistance capillaire du Cobaye. De plus, il ne possède aucune toxicité aux doses actives.

CHAPITRE III

ÉTUDE BIOLOGIQUE DE LA FLAVANNONE

La flavannone que nous avons isolée en faible quantité de la cuticule de l'Arachide présente, elle aussi, une étroite parenté structurale avec les substances habituellement groupées sous le nom de vitamine P.

Il nous a paru intéressant de savoir si cette substance possédait une action sur la résistance capillaire.

En utilisant la technique précédemment décrite (voir chapitre IV de la première partie), nous avons pu préparer une certaine quantité de flavannone que nous avons utilisée pour notre étude.

TABLEAU XI

N°s	Poids (g.)	Sexe	Dose injectée (mg.)	R. C. Initiale	RÉSISTANCE CAPILLAIRE APRÈS :						
					2 h.	6 h.	24 h.	36 h.	48 h.	96 h.	120 h.
1	530	M	2	13	13	14,5	16	20	25	30	30
2	480	M	1	11	10	12	11,5	15	24	25	25
3	390	M	1	13	12	13,5	13,5	15	17	23	24
4	612	F	0,5	12	13	12,5	14	17	23	25	24
5	560	F	0,5	10	11	10,5	11	13	16	18	19
6	355	F	0,1	12	12	11,5	13	12,5	14	13	19

Nous avons mis en jeu six Cobayes auxquels nous avons injecté des quantités de flavannone comprises entre 0,1 et 2 mg., puis nous avons étudié les variations de leur résistance capillaire en fonction du temps.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette expérience se trouvent rassemblés dans le tableau XI.

Ils montrent que la flavannone présente, elle aussi, une action appréciable sur la résistance capillaire; mais cette action se montre un peu différente de celle que nous avons notée avec le chromogène : elle paraît plus lente et plus persistante (voir figure 12).

La flavannone ne présente aucune toxicité, les Cobayes traités par cette substance n'ayant présenté aucun symptôme toxique.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

La flavannone, que l'on trouve en petites quantités dans la cuticule de la graine d'Arachide, présente une action très nette sur la résistance capillaire du Cobaye. Cette action est moins rapide que celle du chromogène, mais elle paraît plus persistante.

Le traitement par la flavannone n'a donné lieu à aucun phénomène toxique.

CHAPITRE IV

ÉTUDE BIOLOGIQUE DU TANNOÏDE

Le tannoïde, rencontré dans la cuticule d'Arachide, peut éventuellement se former par oxydation du chromogène. Sa constitution présente donc une certaine parenté de structure avec les substances précédemment décrites. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant d'étudier ses propriétés sur la résistance capillaire.

A cinq Cobayes, nous avons injecté des doses de tannoïde variant entre 0,5 et 5 mg., et nous avons suivi la résistance capillaire de ces animaux en fonction du temps (*). Les résultats que nous avons obtenus se trouvent mentionnés dans le tableau XII.

Ils montrent que la résistance capillaire des animaux traités ne s'est pas sensiblement modifiée sous l'influence du tannoïde.

Cet essai nous permet de conclure que, contrairement au chromogène et à la flavannone que nous avons étudiés, le tannoïde ne présente aucune action sur la résistance capillaire. Ce résultat doit-il être considéré comme paradoxal ? Il nous semble que non, et ceci pour deux raisons :

1° On sait que si l'on chauffe une solution diluée de catéchine au bain-marie bouillant pendant une heure, la substance obtenue a non seulement perdu son action de renforcement sur la résistance capillaire, mais a tendance, au contraire, à la faire diminuer (Parrot et Cotereau [144]). Cette substance, formée

(*) Les Cobayes utilisés dans cette expérience présentaient tous une résistance capillaire initiale très élevée, mais susceptible d'être encore accrue par injection de flavannone ou de chromogène, ainsi que nous l'avons vérifié ultérieurement.

par condensation de deux molécules de catéchine, présente de grandes analogies de structure avec le tannoïde. On peut donc fort bien concevoir que ce dernier n'ait aucun pouvoir de renforcer la résistance capillaire

TABLEAU XII

N°s	Dose injectée (mg.)	Initiale	RÉSISTANCE CAPILLAIRE APRÈS :			
			24 h.	48 h.	72 h.	96 h.
1	5	30	27	20	19	24
2	2,5	22	20	20	18	21
3	1	25	16	21	20	19
4	1	30	24	26	25	28
5	0,5	20	19	20	19	19

2° Selon Lavollay [104], les substances douées d'activité vitaminique P empêchent l'autoxydation de l'adrénaline. On peut penser que cette propriété se trouve liée au pouvoir réducteur de ces substances, qui s'oxydent aux dépens de l'adrénaline. On peut donc admettre que si elles se trouvent déjà oxydées, comme c'est le cas pour le tannoïde, elles ont perdu leur propriété d'empêcher l'autoxydation de l'adrénaline et, en conséquence, leur action sur la résistance capillaire.

Nous avons vu, dans le premier chapitre de notre étude biologique, que l'extrait total hydrosoluble de la cuticule de l'Arachide présentait une certaine toxicité. Or, les deux premiers constituants de cet extrait se sont avérés inoffensifs. Le tannoïde se trouve-t-il responsable des accidents que nous avons observés ? Nous avons désiré le savoir et, pour cela, nous avons étudié tout d'abord la courbe de poids des animaux que nous venions de traiter par le tannoïde.

Nous n'avons constaté une perte de poids appréciable que chez les Cobayes 1 et 2, ayant reçu respectivement 5 mg. et 2,5 mg. de tannoïde. Afin de préciser ce premier résultat, nous avons à nouveau injecté les mêmes doses de produit à ces deux animaux. Les chiffres que nous avons obtenus se trouvent

réunis dans le tableau XIII. Ils montrent qu'avec une dose suffisante de tannoïde, la courbe de poids du Cobaye va en s'abaissant avec le temps.

TABLEAU XIII

N°s	Poids initial	Dose de tannoïde injectée (mg.)	Poids après 10 jours	Perte de poids (p. 100)
1	400	10	360	10
2	550	5	525	5

Voulant pousser plus loin nos investigations, nous avons sacrifié les animaux et nous avons effectué des coupes de leur foie et de leurs surrénales. Nous avons constaté que ces coupes se montraient comparables à celles pratiquées chez les Cobayes auxquels l'extrait total avait été injecté. La similitude des lésions est particulièrement nette au niveau des surrénales (voir clichés précédents).

Cette série d'essais nous montre que la toxicité de l'extrait aqueux total de la cuticule de l'Arachide est due à la présence du tannoïde.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Le tannoïde que nous avons extrait de la cuticule de la graine d'Arachide ne possède pas la propriété de renforcer la résistance capillaire du Cobaye. De plus, il s'avère toxique pour cet animal.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le tégument de la graine d'Arachide renferme un certain nombre de pigments dont l'étude chimique fait l'objet de la première partie de notre travail.

Nous avons pu isoler et obtenir à l'état pur les quatre substances qui contribuent à donner à ce tégument sa coloration rouge-brunâtre caractéristique :

1° Un pigment flavonique, non encore décrit jusqu'à présent dans l'Arachide, existant à l'état de traces dans les cellules de l'assise interne. Les propriétés physiques et chimiques de cette substance nous ont conduit à conclure que nous avions isolé une *flavannone* ne possédant pas la structure d'un hétéroside;

2° Un pigment leuco-anthocyanique, déjà signalé par Robinson, et que Tayeau a rencontré adsorbé sur les protéides de l'amande. Nous avons démontré que ce leuco-anthocyane existe sous deux formes, méthylée et non méthylée, présentes en quantités égales mais faibles dans les cellules de l'assise externe. Cette substance, pratiquement incolore, joue le rôle de chromogène : une oxydation lente la transforme, en effet, en tanin de couleur rouge-brunâtre. Nous avons émis l'hypothèse que cette transformation permettait d'expliquer la présence d'un tannoïde dans le tégument.

Par déshydratation énergique de ce chromogène, on obtient du cyanidol. Cette seconde transformation ne s'opère pas *in vivo,* car le tégument ne renferme pas de pigments anthocyaniques.

Nous avons proposé pour ce composé une formule en accord à la fois avec les données analytiques et avec les propriétés que nous venons d'énoncer. Cette formule s'avère conforme à l'hypothèse de Robinson relative à la nature des leuco-anthocyanes.

Nous avions primitivement pensé que le chromogène entrait en combinaison avec le glucose pour former un hétéroside. Après isolement et purification à l'aide de techniques diverses, le produit que nous avons obtenu se montre en réalité libre de toute copule glucidique;

3° Un tannoïde catéchique, beaucoup plus abondant que les deux premiers pigments, puisqu'à lui seul il représente 15 p. 100 du poids du tégument. Ce tannoïde manifeste toutes les propriétés d'un tanin condensé; il confère à l'assise externe de la cuticule la couleur rougeâtre déjà signalée. Aucun tanin gallique ne peut être décelé à ses côtés;

4° Enfin, un produit de condensation du tannoïde, qui voisine avec lui dans l'assise externe. Il s'agit d'un phlobaphène, substance amorphe, rouge foncé, que l'on peut aisément reproduire *in vitro* à partir du tannoïde. Le phlobaphène est remarquable par son insolubilité dans l'eau.

Par leur structure chimique, les pigments du tégument de l'Arachide se montrent assez proches voisins des substances généralement décrites comme vitamines P. Partagent-ils avec ces dernières des propriétés physiologiques identiques ? C'est ce que nous avons étudié dans la seconde partie de notre travail.

Chez le Cobaye, la flavannone et le leuco-anthocyane s'avèrent très actifs sur la résistance capillaire qu'ils accroissent de façon notable. Le tannoïde ne manifeste pas de semblables propriétés : contrairement aux deux précédentes substances, il se montre toxique pour le Cobaye, chez lequel il provoque des lésions du tissu hépatique et des surrénales, ainsi qu'un arrêt de la croissance fatal pour l'animal. Les phénomènes toxiques ne se produisent pas en présence de réducteurs tels que le sulfite acide de sodium; nous avons relié leur apparition à la formation de dérivés d'oxydation. Le chromogène leuco-anthocyanique pouvant donner naissance au tannoïde, on voit avec quelle prudence il faut utiliser les dérivés catéchiques comme sources de vitamine P. Il nous paraît indispensable de les stabiliser par addition d'un réducteur ou, mieux, de les remplacer par des dérivés flavoniques, réputés non toxiques et très stables, comme nous avons pu le vérifier en étudiant la flavannone de l'Arachide.

Les quatre pigments que nous avons étudiés présentent entre eux de telles similitudes de structure chimique qu'il nous paraît très vraisemblable de leur assigner une origine

commune. La situation cytologique de chacune de ces substances au sein du tégument de l'Arachide nous permet de penser que leur genèse s'opère de l'intérieur vers l'extérieur de la cuticule, à partir de la flavannone. Ce pigment, présent à l'état de traces, serait transformé dès son apparition en hydroxy-4-flavanne par un processus de réduction. Simple terme de passage, l'hydroxy-4-flavanne s'oxyderait pour former le leuco-anthocyane, oxydé à son tour en tannoïde. Ce dernier pigment se polymériserait enfin pour aboutir au phlobaphène.

On voit que notre hypothèse met en jeu un processus d'oxydo-réduction dont la phase oxydative se déroulerait dans la partie externe du tégument, tandis que la phase réductrice intéresserait les assises les plus internes, renfermant la flavannone.

En résumé, nous avons désiré, au cours de ce travail, jeter un peu de lumière sur la nature et les propriétés de substances dont la présence dans le tégument de l'Arachide n'avait jusqu'à présent suscité que peu d'intérêt, bien qu'elle méritât, il nous semble, d'être mieux connue.

BIBLIOGRAPHIE

1. Allen (A. H.). — Commercial organic analysis, 5 th ed., vol. 5, London, 1927.
2. Ambrose (A. M.) et De Eds (F.). — Effect of rutin on permeability of cutaneous capillaries. *Journ. Pharm. Expér. Thér.*, 1947, **90**, 359.
3. Armentano (L. E. B.). — *Zeitschr. Ges. exper. Med.*, 1937, **102**, 219.
4. Armentano (L. E. B.), Bensath (A.), Beres (T.), Ruszнyack (S.) et Szent-Gyorgyi (A.). — Uber den Einfluss von Substanzen der Flavongruppe auf die Permeabilität der Kapillären. Vitamin P. *Deut. Med. Wochschr.*, 1936, **62**, 1325.
5. Armstrong (E. F.) et Armstrong (K. F.). — The glycosides. 1 vol., Longmans Green, edit., London, 1931.
6. Aubertin (E.), Dangoumeau (A.) et Castagnou (R.). — Dans quelle mesure la farine de tourteau d'arachide deshuilée peut-elle être employée dans l'alimentation de l'homme et des animaux. *Journ. Physiol. Path. gén.*, 1941,1943, **38**, 282.
7. Bacharach (A. L.) et Coates (M. E.). — The biological estimation of vitamin P activity. *Analyst*, 1942, **67**, 313.
8. Bacharach (A. L.) et Coates (M. E.). — The vitamin P activities of Citrus fruits, Rose-Hips, Blanck-Currants, and some fruit products and concentrates. *Journ. Soc. Chem. Ind.*, 1944, **77**, 198.
9. Bacharach (A. L.), Coates (M. E.) et Middleton (T. R.). — A biological test for vitamin P activity. *Biochem. Journ.*, 1942, **36**, 407.
10. Bacharach (A. L.), Coates (M. E.) et Middleton (T. R.). — *Proc. Biochem. Soc. Chem. Ind.*, 1942, **61**, 96.
11. Bancroft (W. B.) et Rutzler (J. E.). — The colloid chemistry of leaf and flower pigments. I. — The precursors of the anthocyanins. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 2738.

12. Bancroft (W. D.) et Rutzler (J. E.). — The colloid chemistry of leaf and flower pigments. II. — Qualitative analysis of leaf pigments. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 2945.
13. Barnell (H. R.) et Barnell (E.). — Studies in tropical fruits. XVI. — The distribution of tannins within the Banana and the changes in their condition and amount during ripening. *Ann. Bot.*, 1945, **9**, 77.
14. Belt (T. H.). — Liver necrosis following burns, simulating the lesions of yellow fever. *Journ. Path. Bact.*, 1939, **48**, 493.
15. Bensath (A.) et Szent-Györgyi (A.). — Vitamin P. *Nature*, 1937, **140**, 426.
16. Bezssonoff (N.). — L'effet antiscorbutique est-il dû à deux substances différentes ? *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 568.
17. Bigwood (E. J.). — Des méthodes physiologiques objectives d'appréciation des états de précarence. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1939, **2**, 12.
18. Binet (L.) et Tanret (P.). — Action du citron sur le syndrome ascitique des cirrhotiques. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp.*, 1941, 832.
19. Blaschko (H.). — Reaction of anthocyans with molybdate. *Biochem. Journ.*, 1944, **38**, 6.
20. Bonifazi (G.) et Capt (E.). — Dosage du tanin du thé. *Mitt. Lebensnr, Hyg.*, 1931, **22**, 39.
21. Borbely (F. Von). — Uber die Blutungsbereichschaft der Haut. *Munch. Med. Wochschr.*, 1930, **77**, 886.
22. Boswell (J. G.). — The constitution of certain nutshells. II. — The pericarp of Corylus avellana (Hazel nut). *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 986.
23. Bougault (J.). — Oxydation de l'anétol et des composés analogues à chaîne latérale propénylique. Thèse Sc., Paris, 1902.
24. Boulanger (P.). — La vitamine P. Action vitaminique des dérivés benzopyraniques. *Exp. ann. Biochim. méd.*, 1944, **4**, 169.
25. Bourne (G. H.). — Vitamin P deficiency in guinea-pigs. *Nature*, 1943, **152**, 659.
26. Boyle (R.). — Experiments and considerations touching colours, 1 vol., London, 1664.
27. Bridel (M.) et Charaux (C.). — L'oroboside, nouveau glucoside hydrolysable retiré de l'*Orobus tuberosus* L. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 615.
28. Briskas (S.) et Delbarre (J.). — Action favorable de certains composés à action vitaminique P dans trois cas de néphrite hématurique. *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, 1947.
29. Buis (L. J.) et Hartman (F. W.). — Histopathology of the liver following superficial burns. *Am. Journ. Clin. Pathol.*, 1941, **11**, 275.

30. Cara (M.) et Monod (R.). — Une méthode d'investigation de l'état des capillaires : l'effet ventouse. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 133.

31. Chambard (P.). — Note sur l'analyse tannique quantitative. Doc. Sc. Techn. Ind. Cuir, 1944, **1**, 12.

32. Chapman (A. C.). — Hop tannin. *Journ. Inst. Brewing*, 1907, **13**, 646.

33. Charaux (C.). — Sur la présence de rutine dans certains végétaux. Préparation et identification de ce glucoside et de ses produits de dédoublement. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, **6**, 641.

34. Chauchard (P.). — La vitamine P. *Rev. scient.*, 1944, **82**, 182.

35. Chevallier (A.). — L'Arachide. *Rev. Bot. appl. et Agr. trop.*, 1933, **13**, 689, et 1934, **14**, 565, 709 et 833.

36. Chevalier (A.). — Sur la manière dont se comporte avec les acides et les alcalins la matière colorante des baies de sureau appliquée sur le papier. *Journ. Pharm.*, 1820, **6**, 177.

37. Chevallier (A.). — Sur la spectrophotométrie dans l'ultraviolet et de son application à l'analyse biologique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 530.

38. Chiray (M.), Lavollay (J.) et Maschas (H.). — Un essai thérapeutique de l'extrait flavonique des écorces d'oranges dans un cas de cirrhose éthylique avec purpura. *Le Foie*, 1942, **1**, 53.

39. Coates (M. E.) et Bacharach (A. L.). — The vitamin P activities of some british fruits and vegetables. *Biochem. Journ.*, 1943, **37**, IV.

40. Combes (R.). — Production d'anthocyane sous l'influence de la décortication annulaire. *Bull. Soc. Bot.*, 1909, **56**, 227.

41. Combes (R.). — Formation de pigments anthocyaniques déterminée dans les feuilles par la décortication annulaire des tiges. *Ann. Sc. nat.*, 1912, **16**, 1.

42. Combes (R.). — Production expérimentale d'une anthocyane identique à celle qui se forme dans les feuilles rouges en automne, en partant d'un composé extrait des feuilles vertes. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, **157**, 1002.

43. Combes (R.). — Passage d'un pigment anthocyanique extrait des feuilles rouges d'automne au pigment jaune contenu dans les feuilles vertes de la même plante. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, **157**, 1454.

44. Combes (R.). — Sur la présence, dans les feuilles et dans les fleurs ne formant pas d'anthocyane, de pigments jaunes pouvant être transformés en anthocyane. *C. R. Ac. Sc.*, 1914, **158**, 272.

45. Combes (R.). — La recherche des pseudo-bases d'anthocyanidines dans les tissus végétaux. *C. R. Ac. Sc.*, 1922, **174**, 58.
46. Combes (R.). — La formation des pigments anthocyaniques. *C. R. Ac. Sc.*, 1922, **174**, 240.
47. Combes (R.). — A propos de publications récentes sur la formation de pigments anthocyaniques. *Bull. Soc. Bot.*, 1923, **23**, 222.
48. Corteel (A.). et Dujardin (P.). — Action de l'épicatéchine sur la résistance capillaire et la tension artérielle contrôlée par une méthode personnelle. *Ann. Biol. clin.*, 1944, **8**, 173.
49. Dalldorff (G.). — Sensitive test for subclinical scurvy in man. *Ann. Journ. Dis. Child.*, 1933, **46**, 794.
50. Danysz (V.). — Action de l'hormone cortico-surrénale sur les capillaires. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 36 et 67.
51. Donzelot (E.), Bardin (P.), Galmiche (P.) et Sénécal (J.). — Scorbut et vitamine P. *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, 1945, **65**, 22.
52. Dott (D. B.). — Dosage du tanin du thé. *Pharm. Journ.*, 1933, **131**, 627.
53. Erb (I. H.), Morgan (E. M.) et Farmer (A. W.). — Pathology of burns. *Ann. Surg.*, 1943, **117**, 234.
54. Etti (K.). — *Ann. Chem.*, 1877, **186**, 327.
55. Euler (H. Von) et Malmberg (M.). — Einfluss der Eingaben von Ascorbinsaüre und Vitamin P (Citrin) auf den Gehalt des Meerschweinchenblutes an vitalfärbaren Erythrocyten. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1937, **249**, 85.
56. Everest (A. E.). — The production of Anthocyanins and Anthocyanidins. *Proc. Roy. Soc.*, 1914, **87 B**, 444.
57. Fear (C. M.). — *Analyst*, 1929, **54**, 316.
58. Filhol (E.). — Observations sur les matières colorantes des fleurs. *C. R. Ac. Sc.*, 1854, **39**, 194.
59. Fincke (H.). — *Bull. off. Off. Intern. Cacao et Chocolat*, 1938, **8**, 225.
60. Fischer (E.) et Freudenberg (K.). — Uber das Tannin und die Synthese ähnlicher Stoffe. *Ber.*, 1912, **45**, 915.
61. Flahault (C.). — Sur la formation des matières colorantes dans les végétaux. *Bull. Soc. Bot.*, 1879, **26**, 268.
62. Franke (H.). — Die Wirkung von Vitamin C, Vitamin P und Fruchtsaftkuren auf die Capillärresistenz bei verschiedenen Erkrankungen. *Zeitschr. Klin. Med.*, 1940, **135**, 283.
63. Freudenberg (K.). — *Ber.*, 1920, **53**, 232 et 1416.
64. Freudenberg (K.). — Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe. 1 vol., Berlin, 1920, p. 4.
65. Freudenberg (K.) et Maitland (P.). — Chemistry of Quebrachotannin. *Journ. Intern. Soc. Leather Trades Chem.*, 1934, **18**, 156.

66. Gabe (M.), Parrot (J. L.) et Cotereau (H.). — Sur les modifications histologiques de la cortico-surrénale du Cobaye au cours de l'avitaminose P. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 982.
67. Galmiche (P.). — La résistance et la perméabilité des vaisseaux capillaires et la vitamine P. Thèse Méd., Paris, 1945.
68. Gautier (A.). — Sur les matières colorantes des vins. *C. R. Ac. Sc.*, 1878, **86**, 1507.
69. Géro (E.). — L'action protectrice de la vitamine P sur l'oxydation de l'acide ascorbique. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 566.
70. Golse (J.). — Accumulation du cuivre dans les téguments de certaines graines. *Journ. Méd. Bordeaux*, 1933, **110**, 310.
71. Göthlin (G. F.). — A method of establishing the vitamin C standard and requirements of physically healthy individuals, by testing the strengh of their cutaneous capillaries. *Scand. arch. Physiol.*, 1931, **61**, 225.
72. Gustavson (K. H.). — Differentiation of the protein groups involved in the fixation of vegetables tannins by collagen. *Svensk Kemisk Tidskrift*, 1941, **53**, 324.
73. Guthrie (J. D.) et Coll. — Isolation of Quercitrin and Quercetin from Goldenrod material. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 1794.
74. Hampton Hoch (J.). — *Journ. Am. Pharm. Assoc.*, 1933, **22**, 121.
75. Hecht (A. F.). — Experimentelle-Klinische Untersuchungen über Hautblutungen in Kindesalter. *Jarbuch. Kinderheilkr.*, 1907, **65**, 113.
76. Herzfeld (E.) et Frieder (A.). — Catechin (inhibitory substance) of the thyroid gland and its therapeutic use in exophtalmic goiter. *Deut. med., Wochschr.*, 1933, **59**, 84; d'après *Chem. Abstr.*, 1934, **28**, 3124.
77. Hess (A. F.). — The involvement of the blood and blood vessels in infantile scurvy. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1913-1914, **11**, 130.
78. Higby (R. H.). — Chemical nature of Hesperidin and its use as source of vitamin P. *Journ. Am. Pharm. Assoc.*, 1941, **30**, 629.
79. Hough (A. T.). — Tanin and urotropin. *Journ. Intern. Soc. Leather Trades Chem.*, 1931, **15**, 406.
80. Javillier (M.). — La notion de vitamine P. *Arch. hosp.*, 1944, **21-22**, 329.
81. Javillier (M.). — Les substances agissant sur la résistance et la perméabilité capillaires, et la notion de vitamine P. *Schw. Chemiker-Zeit.*, 1946, **29**, 197.
82. Jonesco (S.). — Transformation, par oxydation, en pigment rouge, des chromogènes de quelques plantes. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, **173**, 1006.

83. Jonesco (S.). — Transformation d'un chromogène des fleurs jaunes de *Medicago falcata* sous l'action d'une oxydase. *C. R. Ac. Sc.*, 1922, **175**, 592.
84. Kapeller (K.). — Versuche über die Bestimmung der wasserlöslichen Gerbstoffe im Kakao nach dem Cinchoninverfahren. *Zeitschr. Unters. Lebensmit.*, 1939, **78**, 393.
85. Karrer (P.). — Les matières colorantes des fleurs. *Bull. Soc. Chim.*, 1928, **43**, 1041.
86. Karrer (P.) et Walker (O.). — Plant pigments. LI-Pure α-carotene. *Helv. chim. Acta*, 1933, **16**, 641; d'après *Chem. Abstr.*, 1933, **27**, 4800.
87. Karrer (P.) et Weber (K.). — Resoln. of natural anthocyanin. mixts. by adsorption analysis. *Helv. chim. Acta*, 1936, **19**, 1025; d'après *Chem. Abstr.*, 1937, **31**, 1027.
88. Karzel (H.). — *Oesterr. bot. Ztg.*, 1906, **56**, 348.
89. Keeble (F.) et Armstrong (E. F.). — The role of oxydases in the formation of the anthocyan pigments of plants. *Journ. Gen.*, 1912, **2**, 277.
90. Keeble (F.), Armstrong (E. F.) et Jones (W. N.). — The formation of the anthocyan pigments of plants. Part IV. *Proc. Roy. Soc.*, 1913, **86 B**, 308.
91. Kibrick (A. C.) et Goldfarb (A. E.). — The evaluation of the assay of vitamin P by means of the effect of low pressure on mice. *Journ. Pharm. Exper. Ther.*, 1944, **82**, 211.
92. Knapp (A. W.) et Hearne (J. F.). — The presence of leucoanthocyanins in Criollo Cacao. *Anal.*, 1939, **64**, 475.
93. Koschara (W.). — Adsorptions Analyse wässriger Lösungen. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1936, **239**, 89.
94. Kozlowski (A.). — Formation du pigment rouge de *Beta vulgaris* par oxydation des chromogènes. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, **173**, 855.
95. Krogh (A.) et Rehberg (P. B.). — Sur l'influence de l'hypophyse sur la tonicité des capillaires. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 461.
96. Kryz (F.). — Uber farbenreaktion der Samenschalenfarbstoffe der Erdnuss und der Haselnuss. *Chem. Centr.*, 1922, **93**, 738.
97. Laborde (J.). — Sur l'origine de la matière colorante des raisins rouges et autres organes végétaux. *C. R. Ac. Sc.*, 1908, **146**, 1411.
98. Laederich (L.). — Sur le traitement des ascites cirrhotiques par le jus de citron. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp.*, 1941, **57**, 335.
99. Lajos (S.). — *Klin. Wochschr.*, 1937, **46**, 1615.
100. Lajos (S.). — Clinical experience with Citrin (vitamin P). *Orvosi Hetilap*, 1938, **82**, 642.

101. Lavollay (J.). — Activité vitaminique P et résistance capillaire. *Ann. pharm. Franç.*, 1943, **1**, 39.
102. Lavollay (J.). — Structure et rôle fonctionnel de la vitamine P. 1 vol., Hermann, édit., Paris, 1943.
103. Lavollay (J.). — Action de l'esculoside et de l'esculétol sur la résistance des capillaires. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 270.
104. Lavollay (J.) et Neumann (J.). — Fonction vitaminique P. *C. R. Ac. Sc.*, 1941, **212**, 251.
105. Lavollay (J.), Parrot (J. L.) et Sevestre (J.). — Sur la nature de la vitamine P, l'Epicathéchine, substance jusqu'ici la plus active sur la résistance capillaire. *C. R. Ac. Sc.*, 1943, **217**, 540.
106. Lavollay (J.) et Patron (A.). — Les jus de fruits. II. — Conservation et propriétés. *Ann. Nutr. Alim.*, 1947, **1**, 529.
107. Lavollay (J.) et Sevestre (J.). — Le vin rouge considéré comme aliment riche en vitamine P. *C. R. Ac. Agr.*, 1944, **30**, 259.
108. Lavollay (J.) et Vignau (M.). — Microdosage colorimétrique de la catéchine. *C. R. Ac. Sc.*, 1943, **217**, 86.
109. Lebreton (M.). — Sur la matière cristalline des oranges et analyse de ces fruits non encore développés. *Journ. Pharm. Chim.*, 1828, **14**, 377.
110. Leser (A. J.) et Coll. — *Journ. Pharm. Exper. Ther.*, 1941, **72**, 26.
111. Lotze (H.). — *Deut. Med. Wochschr.*, 1938, **64**, 177.
112. Lotze (H.). — Untersuchungen über das Vitamin P. *Zeitschr. Ges. exper. Med.*, 1938, **102**, 697.
113. Mac Cance (R. A.). — The colorimetric determination of Rhamnose. *Biochem. Journ.*, 1929, **23**, 1172.
114. Mac Clure (R. D.) et Lam (C. R.). — Problems in the treatment of burns : Liver necrosis as a lethal factor. *South. Surg.*, 1940, **9**, 223.
115. Machebœuf (M.) et Coll. — Rapports au C. N. R. S. A., Paris, 1940.
116. Machebœuf (M.) et Fethke (N.). — Nouvel appareil pour l'épuisement continu dans le vide et à froid par des solvants volatils. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 229.
117. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Valeur alimentaire de la graine d'Arachide. *Bull. Ac. Méd.*, 1942, **126**, 255; Sur la valeur alimentaire des protéides de la graine d'Arachide. *C. R. Ac. Sc.*, 1942, **214**, 37; Les protéides de la graine d'Arachide. V^e^ Mémoire : démonstration de l'existence de d (-) thréonine dans ces protéides. Composition et valeur alimentaire. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, **24**, 281; Etudes biochimiques sur le tourteau d'Arachide. *Corps gras et savons*, 1944, **2**, 43,

118. Mackinney (G.). — Plant pigments. *Ann. Rev. Biochem.*, 1940, **9**, 459.

119. Majoski (G. J.) et Coll. — Vascular fragility and permeability as influenced by various agents. *Journ. Pharm. Exp. Ther.*, 1944, **80**, 1.

120. Marshall (C. R.) et Norris (F. W.). — The analysis of carbohydrates of the cell wall of plants. III. — Determination of methylpentoses : factors influencing the decomposition of methylfurfuraldehyde during distillation. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 1053.

121. Marschall (C. R.) et Norris (F. W.). — The analysis of carbohydrates of the cell wall of plants. IV. — Determination of methylpentoses as methylfurfuraldehyde : methods of distillation and precipitation. *Biochem Journ.*, 1937, **31**, 1289.

122. Maschas (H. B.) et Lavollay (J.). — Les modifications de la perméabilité capillaire et leurs conséquences. Rôle des vitamines P. *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, 1944, 212.

123. Menkin (V.). — Isolation and properties of factor responsible for increased permeability in inflammation. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1937, **36**, 164.

124. Meunier (P.). — L'adsorption sélective : la chromatographie. *Chim. Ind.*, 1944, **52**, 68.

125. Mirande (M.). — Sur l'origine de l'anthocyanine déduite de l'observation de quelques insectes parasites des feuilles. *C. R. Ac. Sc.*, 1907, **145**, 1300.

126. Molisch (H.). — Ueber ein neues, einen carminrothen Farbstoff enzeugendes Chromogen bei Schenckia blumenaviana. *Ber. Bot. Ges.*, 1901, **19**, 149.

127. Moll (T.). — Zur Frage des Vitamin P. *Klin Wochschr.*, 1938, **16**, 1653.

128. Mouriquand (G.). — Vitamines et carences alimentaires. 1 vol., Albin-Michel, édit., Paris, 1942.

129. Naghski (J.), Porter (W. L.) et Couch (J. F.). — Isolation of Rutin from two varieties of Forsythia. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 572.

130. Nakamura, Ohta et Hukuti. — *Journ. Pharm. Soc. Japan*, 1936, **56**, 68.

131. Nierenstein (M.). — Ueber die quantitative Bestimmung der Gerbstoffe mittels Caseins. *Chem. Ztg.*, 1911, 31.

132. Nierenstein (M.). — *Pharm. Journ.*, 1926, **116**, 287.

133. Nierenstein (M.). — The natural organic tannins. 1 vol., Churchill, édit., London, 1934.

134. Nierenstein (M.). — *Analyst*, 1943, **68**, 212.

135. Nierenstein (M.). — A micromethod for the estimation of tannin. *Analyst*, 1944, **69**, 91.

136. Nierenstein (M.) et Tryon (I.). — Triglycylglycin, reagent of tannins. *Analyst*, 1942, **67**, 389.
137. Noack (K.). — Untersuchungen über den Anthocyanstoffwechsel auf Grund der chemischen Eigenschaften der Anthocyangruppe. *Zeitschr. Bot. Jena*, 1918, **10**, 561.
138. Nobécourt (P.) et Briskas (S.). — Le syndrome humoral pendant la longue évolution d'une néphrite hématurique. *Bull. Soc. Péd.*, 1935.
139. Onslow (M. W.). — The Anthocyanin pigments of plants. 1 vol., University press, édit., Cambridge, 1925.
140. Palladin (W.). — Ueber das Wesen der Pflanzenatmung. *Biochem. Zeitschr.*, 1909, **18**, 151.
141. Paris (J.). — Action thérapeutique du jus de citron dans un cas de cirrhose ascitique. *Echo méd. Nord.*, 1942, **13**, 575.
142. Parkin (J.). — On a brilliant pigment appearing after injury in species of Jacobinia. *Ann. Bot.*, 1905, **19**, 167.
143. Parrot (J. L.). — La vitamine P. Recherches physiologiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 171.
144. Parrot (J. L.) et Cotereau (H.). — Antivitamine P. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 1051.
145. Parrot (J. L.) et Cotereau (H.). — La vitamine P et l'oxydation de la vitamine C. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 61.
146. Parrot (J. L.), Gabe (M.) et Cotereau (H.). — Sur l'avitaminose P expérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 750.
147. Parrot (J. L.), Gabe (M.) et Cotereau (H.). — Sur la définition expérimentale de la vitamine P. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 752.
148. Parrot (J. L.) et Galmiche (P.). — La vitamine P (épicatéchine) et la mesure de la résistance capillaire en clinique. *Ann. Biol. clin.*, 1944, **2**, 161.
149. Parrot (J. L.) et Galmiche (P.). — Vitamine P et temps de saignement. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 948.
150. Parrot (J. L.), Galmiche (P.) et Cotereau (H.). — L'avitaminose P. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 496.
151. Peche (K.). — Ueber eine neue Gerbstoffreaktion und ihre Beziehung zu den Anthokyanen. *Ber. Bot. Ges.*, 1913, **31**, 462.
152. Perrot (E.). — Matières premières usuelles du règne végétal. 3 vol., Masson, édit., Paris, 1944; **2**, 1533.
153. Peters (C.). — Analyse quantitative des tannins. *Cuir techn.*, 1931, **20**, 40.
154. Petrie (J. M.). — The yellow pigments of Australian Acacias. *Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 957.
155. Phillips (R. C.). — *Journ. Am. Leather Chem. Assoc.*, 1922, **17**, 565.
156. Pieraerts (J.) et Tanret (G.). — Sur les graines du *Tetrapleura Thonnongii*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 457.

157. Pollard (A.). — Vitamin P in Blackcurrants. *Nature*, 1942, **150**, 490.
158. Prillieux (E.). — Coloration en bleu des fleurs de quelques orchidées sous l'influence de la gelée. *Bull. Soc. Bot.*, 1872, **19**, 152.
159. Puig-Muset (P.) et Garcia-Valdecasas (F.). — Estudios sobre la vitamina P. Instituto Nacional de Ciencas Medicas. Madrid, 1944; **2**, 725.
160. Rabaté (J.). — Sur la présence du rutoside dans les tiges foliées du *Buplevrum falcatum* L. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 974.
161. Rabaté (J.). — Les anthocyanosides. Leur synthèse. *Journ. Pharm. Chim.*, 1933, **17**, 433.
162. Rabaté (J.). — Contribution à l'étude biochimique des Salicacées. V. — Rapports du salipurposide avec le naringoside et l'isohespéridoside. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 314.
163. Rabaté (J.). — Contribution à l'étude biochimique des Salicacées. VII. — *Salix repens* L. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 328.
164. Rackham Holt. — G. W. Carver, 1 vol., Doubleday and C°, édit., New-York, 1946.
165. Rapaport (H. G.) et Klein (S.). — *Journ. Pediat.*, 1941, **18**, 321.
166. Raunert (M.). — Die bluttstillende Wirkung des Citrins (P Vitamin). *Zeitschr. Urol.*, 1938, **32**, 630.
167. Raunert (M.). — *Munch. Med. Wochschr.*, 1941, **36**, 986.
168. Richter (V. Von) et Anschütz (R.). — The chemistry of the carbon compounds. 4 vol., 3e édit., Elsevier, édit., New-York, 1946; **3**, p. 222.
169. Rigdon (R. H.). — Demonstration of a capillary permeability factor in tissue extracts from normal Rabbits. *Arch. Surg.*, 1940, **41**, 96.
170. Robertson (A.) et Robinson (R.). — Note on the caracterisation of the anthocyanins and anthocyanidins by means of their colour reactions in alkaline solutions. *Biochem. Journ.*, 1929, **23**, 35.
171. Robinson (G. M.). — Leucoanthocyanins. Part III. Formation of cyanidin chloride from a constituent of the gum of Butea frondosa. *Journ. Chem. Soc.*, 1937, 1157.
172. Robinson (G. M.) et Robinson (R.). — A survey of anthocyanins. *Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 1687.
173. Robinson (G. M.) et Robinson (R.). — A survey of anthocyanins. III. — Notes on the distribution of leuco-anthocyanins. *Biochem. Journ.*, 1933, **27**, 206.
174. Roskam (J.). — Le purpura provoqué par hypertension veineuse (signe du brassard). Rapport au XXe Congrès français de Médecine, Montpellier, 1929, p. 409.

175. Russel (A.). — Synthèse des phlobatanins. *Journ. Chem. Soc.*, 1934, 218; d'après *Bull. Soc. Chim. Fr. (doc.)*.
176. Russel (A.) et Todd (J.). — The constitution of Tannins. Part V. — The synthesis of some flavpinacols. *Journ. Chem. Soc.*, 1937, 421.
177. Rusznyack (S.) et Szent-Györgyi (A.). — *Nature*, 1936, **138**, 27.
178. Rutzler (J. E.). — The precursors of the anthocyanins of Autumn foliage. *Journ. Am. Chem., Soc.*, 1939, **61**, 1160.
179. Rygh (O.) et Rygh (A.). — Chemische Untersuchungen über das antiscorbutische Vitamin. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1932, **204**, 105.
180. Salvioli (G.). — Neue Richtungen im Studium der Kapillärgefässe am lebenden Objekt. *Munch. Med. Wochschr.*, 1933, **80**, 937.
181. Sarthou (S.). — Etude historique et critique, recherches expérimentales sur les protéides de l'Arachide *(Arachis hypogæa* L.). Thèse Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1941.
182. Scarborough (H.). — *Lancet*, 1938, **2**, 610.
183. Scarborough (H.). — Vitamin P. *Biochem Journ.*, 1939, **33**, 1400.
184. Scarborough (H.). — *Journ. Physiol.*, 1941, **100**, 8 P.
185. Scarborough (H.). — The vitamin P potency of foodstuffs. *Biochem. Journ.*, 1943, **37**, XIII.
186. Scarborough (H.) et Steward (C. P.). — *Lancet*, 1938, **2**, 610.
187. Schaber (E. F.). — Das Permeabilitäts-vitamin P (Citrin Bayer) als neuer Weg in der Ekzembehandung. *Munch. Med. Wochschr.*, 1941, **36**, 986.
188. Schmidt (L.) et Kotter (E.). — The pigment of common mullein (Flores verbasci). *Monatsh.*, 1932, **59**, 341; d'après *Chem. Abstr.*, 1932, **26**, 3259.
189. Scott-Moncrieff (R.). — The Magenta flower pigment of Anthirrhinum majus. *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 753.
190. Scott-Moncrieff (R.). — The flower pigment of Primula Polyanthus. *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 767.
191. Silva Mello (A. D.). — Die Wandreresistenz der Blutkapillären. *Munch. Med. Wochschr.*, 1929, **76**, 1717.
192. Skarzynski (B.). — Spektrographische Untersuchungen von Flavonfarbstoffen. *Biochem. Zeitschr.*, 1939, **301**, 150.
193. Sosa (A.) et Sannié (C.). — Le citrifolioside, flavonoside nouveau de *Citrus trifoliata* L., *C. R. Ac. Sc.*, 1946, **223**, 45.
194. Stiasny. — *Collegium*, 1912, **1**, 483 et **2**, 1485.
195. Szent-Györgyi (A.) et Coll. — *Journ. Pratic.*, 1942, **1**, 2.
196. Tatlock (R. R.) et Thompson (R. T.). — Analysis of Tea and Tea infusions. *Analyst*, 1910, **35**, 103.
197. Tayeau (F.). *In* Sarthou [181] et *in* Machebœuf et Tayeau. — *Corps gras et savons*, 1944, **2**, 43.

198. Tayeau (F.) et Masquelier (J.). — L'arachidoside, nouvel hétéroside extrait de la graine d'Arachide *(Arachis hypogaea* L.). *C. R. Ac. Sc.*, 1947, **224**, 290.
199. Tayeau (F.) et Masquelier (J.). — Localisation de l'arachidoside dans la graine d'Arachide *(Arachis hypogaea* L.). *Bull. trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1947, **85**, 5.
200. Taylor (R. L.). — Rutin from Buckwheat. *Chem. Ind.*, 1946, **59**, 74.
201. Tey (A.). — Die normale Kapillarfragilität beim Menschen. Eine neue Method zu ihrer Bestimmung. *Schw. Med. Wochschr.*, 1941, **71**, 685.
202. Thomas (P.). — Manuel de Biochimie, 1 vol., 2e édit., Masson, édit., Paris, 1946, p. 901.
203. Thuau (U. J.). — L'analyse tannique quantitative. *Cuir Techn.*, 1942, **31**, 5.
204. Tswett (M.). — Beiträge zur Kenntnis der Anthocyane. Ueber künstliches Anthocyan. *Biochem. Zeitschr.*, 1913, **58**, 225.
205. Tucakov (Y. M.). — Contribution à l'étude des tanins végétaux. Thèse Univ. (Pharm.), Nancy, 1934.
206. Ungar (G.). — Action of drugs on bleeding time. *Journ. Physiol.*, 1944, **103**, 18 P.
207. Ungar (G.). — Endocrine reaction to tissue injury. *Nature*, 1944, **146**, 312.
208. Vacek (V.). — Neuere Erkentnisse über Vitamin P. *Schw. Med. Wochschr.*, 1941, **71**, 155.
209. Vignau (M.). — Détermination quantitative des cathéchines. *Fruits d'outre-mer*, 1946, **1**, 276.
210. Wells (D. B.), Humphrey (H. D.) et Coll (J. J.). — The relation of tannic acid to liver necrosis occuring in burns. *New England Journ. Med.*, 1942, **226**, 629.
211. Wheldale (M.). — On the nature of anthocyanin. *Proc. Phil. Soc. Cambridge*, 1909, **15**, 137.
212. Wheldale (M.). — On the formation of anthocyanin. *Journ. Genetics*, 1911, **1**, 133.
213. Wigand (A.). — Einige Sätze über die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes und der Pflanzenfarbe. *Bot. Zeitschr.*, 1862, **20**, 121.
214. Willstaetter (R.) et Everest (A. E.). — Ueber den Farbstoff der Kornblume. *Liebigs Ann. Chem.*, 1913, **401**, 189.
215. Willstaetter (R.) et Mallison (H.). — Ueber die Verwandtschaft der Anthocyane und Flavone. *Sitz Ak. Wiss.*, 1914, 769.
216. Wilson (C. W.). — A study of the boric acid color reaction of flavon derivatives. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 2303.
217. Wilson (J. H.). — The chemistry of Leather manufacture, 1 vol., 2e édit., New-York, 1928; p. 448.

218. Wilson (R. H.), Mortarotti (T. G.) et Doxtader (E. K.). — Toxicity studies on Rutin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1947, **64**, 324.

219. Wilson (W. C.), Mac Gregor (A. R.) et Stewart (C. P.). — The clinical course and pathology of burns and scalds under modern methods of treatment. *Brit. Journ. Surg.*, 1938, **25**, 826.

220. Zacho (C. E.). — *Zeitschr. Urol.*, 1938, **32**, 630.

221. Zacho (C. E.). — *Acta pathol. microbiol. Scand.*, 1939, **16**, 144.

222. Zahorski (W.). — Valeur clinique des recherches sur la résistance et la perméabilité des capillaires sanguins cutanés à l'aide de l'appareil de Gorecki-Zahorski. *Le Sang*, 1940-1941, **14**, 441.

223. Zechmeister (L.) et Cholnoky (H.). — Die chromatographische Adsorption Methode. 1 vol., Vienne, 1937.

224. Zilva (S. S.). — Vitamin P. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 915 et 1488.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 3

PREMIÈRE PARTIE

Etude chimique des pigments de la graine d'Arachide.

CHAPITRE PREMIER. — LE TÉGUMENT DE L'ARACHIDE 9
I. — Etude botanique 9
II. — Composition chimique 11
III. — Recherches sur les matières colorées du tégument. 12

CHAPITRE II. — A LA RECHERCHE D'UNE MÉTHODE 14
I. — Essais préliminaires 14
II. — Recherche d'un solvant pour l'extraction 16
III. — Procédé initial d'extraction 20
IV. — Sur la nécessité de délipider les cuticules 22
V. — Influence jouée par l'acidité du solvant. Mise en évidence d'un chromogène 24
VI. — Bilan d'extraction 26
VII. — Procédé définitif d'extraction 27
VIII. — Résultats quantitatifs de l'extraction 27
Conclusions du Chapitre II 28

CHAPITRE III. — ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES PIGMENTS DE LA CUTICULE DE L'ARACHIDE 29
I. — Etude de l'extrait sec obtenu selon la méthode précédemment exposée 29
II. — La fraction soluble dans l'éther 31
III. — La fraction insoluble dans l'éther 34
Conclusions du Chapitre III 41

Pages

CHAPITRE IV. — ETUDE DE LA FLAVONE 42
I. — Extraction 42
II. — Caractérisation d'une flavannone 43
III. — Propriétés 50
Conclusions du Chapitre IV 51

CHAPITRE V. — LE CHROMOGÈNE 52
I. — Généralités 52
II. — Extraction 53
III. — Propriétés physiques 55
IV. — Transformation en cyanidol 55
V. — Constitution chimique 57
Conclusions du Chapitre V 65

CHAPITRE VI. — LE TANNOÏDE ET LE PHLOBAPHÈNE 66
I. — Le tannoïde 66
II. — Le phlobaphène 69
Conclusions du Chapitre VI 70

CHAPITRE VII. — LOCALISATION CYTOLOGIQUE DES PIGMENTS DE LA CUTICULE DE L'ARACHIDE 71
Conclusions du Chapitre VII 72

DEUXIÈME PARTIE

Propriétés biologiques des pigments de la graine d'Arachide.

CHAPITRE PREMIER. — TOXICITÉ 77
Conclusions du Chapitre premier 83

CHAPITRE II. — ETUDE BIOLOGIQUE DU CHROMOGÈNE 84
La vitamine P 84
Etude de l'activité pharmacodynamique du chromogène.. 87
Conclusions du Chapitre II 92

CHAPITRE III. — ETUDE BIOLOGIQUE DE LA FLAVANNONE 93
Conclusions du Chapitre III 94

CHAPITRE IV. — ETUDE BIOLOGIQUE DU TANNOÏDE 95
Conclusions du Chapitre IV 97

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 99

BIBLIOGRAPHIE 103

Bordeaux. — Imp. E. DROUILLARD, 3, place de la Victoire.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ :

LES MÉTHODES DE DOSAGE DE LA STREPTOMYCINE

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
L. GENEVOIS.

Vu et approuvé :
Le Doyen,
G. BRUS.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 25 Juin 1948.
Le Recteur,
A. MARCHAUD.